

Via de sinalização Wnt/LRP5/ β -catenina e dano na artrite reumatoide

José Miguel Andrade de Oliveira Bernardes

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Novembro de 2017

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em **Medicina**,
apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

Orientador:

Professor Doutor Francisco Simões Ventura
Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Coorientadora:

Professora Doutora Maria João Martins
Departamento de Biomedicina, Unidade de Bioquímica, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Artigo 48, Parágrafo 3º: “A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na dissertação”
(Regulamento da Faculdade de Medicina da Universidade do
Porto – Decreto-Lei nº 19337, 29 de Janeiro de 1931).

Exmo. Senhor
Mestre José Miguel Andrade de Oliveira Bernardes
Rua da Venezuela, nº 296, 5º
4150-743 PORTO

v.referência

v.comunicação

n.referência

data

FOA.26. 1305.2018

assunto

Provas de Doutoramento.

19 FEV 2018

U. PORTO

Informo V. Ex^ª. que, por meu despacho de 2018.02.16, proferido no âmbito de delegação reitoral, nomeei o júri das provas de doutoramento em Medicina, requeridas por V. Ex^ª., com a seguinte constituição:

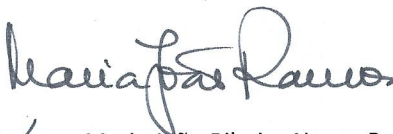
Presidente: Doutor José Agostinho Marques Lopes, Professor Catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (nomeado por despacho reitoral de 2018.02.15)

Vogais:

- Doutor João Eurico Cortez Cabral da Fonseca, Professor Catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa;
- Doutor Jaime da Cunha Branco, Professor Catedrático da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa;
- Doutor António Albino Coelho Marques Abrantes Teixeira, Professor Catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto;
- Doutor Francisco Fernando da Rocha Gonçalves, Professor Catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto;
- Doutor Davide Maurício Costa Carvalho, Professor Associado da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto;
- Doutor Francisco António Costa Simões Ventura, Professor Auxiliar aposentado da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

Com os melhores cumprimentos,

A Vice-Reitora,



(Prof.ª. Doutora Maria João Ribeiro Nunes Ramos)

CORPO CATEDRÁTICO DA FACULDADE DE MEDICINA DO PORTO

Professores Efetivos – Catedráticos

Doutora Maria Amélia Duarte Ferreira

Doutor José Agostinho Marques Lopes

Doutor Patrício Manuel Vieira Araújo Soares Silva

Doutor Alberto Manuel Barros da Silva

Doutor José Manuel Lopes Teixeira Amarante

Doutor José Henrique Dias Pinto de Barros

Doutora Maria Fátima Machado Henriques Carneiro

Doutora Isabel Maria Amorim Pereira Ramos

Doutora Deolinda Maria Valente Alves Lima Teixeira

Doutora Maria Dulce Cordeiro Madeira

Doutor Altamiro Manuel Rodrigues Costa Pereira

Doutor José Carlos Neves da Cunha Areias

Doutor Manuel Jesus Falcão Pestana Vasconcelos

Doutor João Francisco Montenegro Andrade Lima Bernardes

Doutora Maria Leonor Martins Soares David

Doutor Rui Manuel Lopes Nunes

Doutor José Eduardo Torres Eckenroth Guimarães

Doutor Francisco Fernando Rocha Gonçalves

Doutor José Manuel Pereira Dias de Castro Lopes

Doutor António Albino Coelho Marques Abrantes Teixeira

Doutor Joaquim Adelino Correia Ferreira Leite Moreira

Doutora Raquel Ângela Silva Soares Lino

Professores Jubilados ou Aposentados

Doutor Alexandre Alberto Guerra Sousa Pinto
Doutor Álvaro Jerónimo Leal Machado de Aguiar
Doutor António Augusto Lopes Vaz
Doutor António Carlos de Freitas Ribeiro Saraiva
Doutor António Carvalho Almeida Coimbra
Doutor António Fernandes Oliveira Barbosa Ribeiro Braga
Doutor António José Pacheco Palha
Doutor António Manuel Sampaio de Araújo Teixeira
Doutor Belmiro dos Santos Patrício
Doutor Cândido Alves Hipólito Reis
Doutor Carlos Rodrigo Magalhães Ramalhão
Doutor Cassiano Pena de Abreu e Lima
Doutor Eduardo Jorge Cunha Rodrigues Pereira
Doutor Fernando Tavarela Veloso
Doutor Henrique José Ferreira Gonçalves Lecour de Menezes
Doutor Jorge Manuel Mergulhão Castro Tavares
Doutor José Carvalho de Oliveira
Doutor José Fernando Barros Castro Correia
Doutor José Luís Medina Vieira
Doutor José Manuel Costa Mesquita Guimarães
Doutor Levi Eugénio Ribeiro Guerra
Doutor Luís Alberto Martins Gomes de Almeida
Doutor Manuel Alberto Coimbra Sobrinho Simões
Doutor Manuel António Caldeira Pais Clemente
Doutor Manuel Augusto Cardoso de Oliveira
Doutor Manuel Machado Rodrigues Gomes
Doutor Manuel Maria Paula Barbosa
Doutora Maria da Conceição Fernandes Marques Magalhães
Doutora Maria Isabel Amorim de Azevedo
Doutor Ovídio António Pereira da Costa
Doutor Rui Manuel Almeida Mota Cardoso
Doutor Serafim Correia Pinto Guimarães
Doutor Valdemar Miguel Botelho dos Santos Cardoso

Doutor Walter Friedrich Alfred Osswald

Ao abrigo do Artigo 8.º do Decreto-Lei n.º 388/70, fazem parte desta dissertação as seguintes publicações/artigos submetidos:

1. M Bernardes, TS Vieira, MJ Martins, R Lucas, L Costa, JG Pereira, F Ventura, E Martins. **Myocardial perfusion in rheumatoid arthritis patients: associations with traditional risk factors and novel biomarkers.** *Biomed Res Int* 2017; 2017:6509754. doi: 10.1155/2017/6509754.
2. M Bernardes, A Madureira, A Oliveira, MJ Martins, R Lucas, L Costa, JG Pereira, F Ventura, I Ramos, E Martins. **Coronary artery calcium score in Rheumatoid Arthritis patients: associations with apolipoproteins and disease biomarkers.**
(submetido à revista *Int J Rheum Dis* em setembro de 2017)
3. Bernardes M, Oliveira A, Martins MJ, Lucas R, Costa L, Pereira J, Ramos I, Machado JC, Simões-Ventura F. **LRP5 gene polymorphisms and radiographic joint damage in Rheumatoid Arthritis patients.**
(submetido à revista *Osteoporos Int* em novembro de 2017)
4. Bernardes M, Vieira T, Lucas R, Pereira J, Costa L, Simões-Ventura F, Martins MJ. **Serum serotonin levels and bone in rheumatoid arthritis patients.** *Rheumatol Int* 2017 37(11): 1891-8. doi: 10.1007/s00296-017-3836-9.

À Elisabete

**Aos meus pais,
José Manuel e Maria José**

**Às minhas filhas,
Carolina e Leonor**

**Aos meus sogros,
Carlos e Rosa**

AGRADECIMENTOS

Como aluno do curso de Medicina, agradeço ao Professor Doutor Pinto Machado o exemplo de organização e sistematização assim como a sua capacidade de síntese, tão patente nos seus sumários extremamente cuidados.

Mais tarde, na Anatomia Patológica Geral, à Professora Doutora Fátima Carneiro, e na Anatomia Patológica Especial, à Professora Doutora Clara Sambade, pela excelente qualidade das suas aulas práticas e teórico-práticas, pelo espírito crítico e científico, muito agradeço por terem semeado o meu gosto pela fisiopatologia das doenças e pela investigação de translação.

Aquando da escolha da especialidade, a Reumatologia significou, por um lado, manter a capacidade de gerir o doente e a doença na globalidade e, por outro, representou o encanto pelas doenças de sistema, a imunologia na práxis e a elevada especificidade na multidisciplinaridade.

Como interno de especialidade, tenho muito a agradecer ao Dr. José Araújo Pinto, ilustre especialista em Reumatologia, que muito me ensinou desta arte de ser reumatologista. Contudo, e mais tarde, é ao Professor Doutor Francisco Simões Ventura que tenho que agradecer o entusiasmo, a iniciativa, a compreensão, a confiança, a amizade e a total disponibilidade para que este projeto de investigação avançasse.

Um elemento chave no sucesso desta tese foi sem dúvida alguma a Professora Doutora Maria João Martins, incansável na sua disponibilidade, colocou neste projeto todo o seu rigor científico e capacidade crítica. Ela acolheu e orientou este projeto no Departamento de Biomedicina/Bioquímica, após discussão e aprovação do mesmo pela então directora de departamento, a Professora Doutora Isabel Azevedo. Além disso, muito agradeço à Dra Conceição Gonçalves, que disponibilizou os recursos técnicos e humanos do Laboratório Nobre da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, onde armazenámos todas as amostras biológicas dos nossos doentes, realizando aí todas as técnicas de ELISA especiais. Um quarto elemento chave neste projeto foi o Professor Doutor José Carlos Machado, que abriu o seu laboratório no IPATIMUP para o estudo genético das amostras biológicas dos nossos doentes. Também uma palavra de apreço à Professora Doutora Isabel Ramos que cedeu o seu próprio gabinete na Radiologia, com acesso ao Pax (programa informático específico do Serviço de Radiologia) e aos seus excelentes ecrãs para realizarmos os scores radiográficos.

A todos os elementos do Serviço de Medicina Nuclear, que acolheram e participaram neste projeto, nomeadamente, o seu Diretor, o Dr. Jorge Gonçalves Pereira, e os seus especialistas, Dr. Tiago Vieira, Dra. Ana Oliveira, Dra. Teresa Faria e Dr. Helder Pereira, assim como o técnico da densitometria óssea.

A todos os elementos de Serviço de Reumatologia reitero também os meus agradecimentos, particularmente, às Dras. Alexandra Bernardo e Sofia Pimenta, pelo companheirismo, pela amizade, pela ajuda diária com os doentes e pela disponibilidade, assim como à Dra. Lúcia Costa pelo seu apoio incondicional neste e noutros projetos.

Aos doentes, a quem devo muito do que aprendi na arte da Medicina, dedico igualmente este trabalho e agradeço a total disponibilidade com que embarcaram nesta investigação clínica.

GLOSSÁRIO

A

ACC: *American College of Cardiology*
ACPAs: anticorpos anti-peptídeos citrulinados cíclicos
ACR: *American College of Rheumatology*
ADAMTS5: *ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 5*
ADN: ácido desoxirribonucleico
Angio-TC: tomografia computadorizada com angiografia
Anti-Carp: anti-peptídeos carbamílicos
Apo: apolipoproteína
AR: artrite reumatoide
ARAs: antagonistas do receptor da angiotensina II
ARNm: ácido ribonucleico (ARN) mensageiro

B

β-CTX: *beta-carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen*
BMI: *body mass index*
BMP: *bone morphogenetic protein*
BNP: *brain natriuretic peptide*/ peptídeo natriurético cerebral
boDMARDs: *biological original synthetic disease-modifying antirheumatic drugs*

C

C5-TRAF1: *complement component 5 -tumor necrosis factor receptor-associated factor 1*
CAC: *coronary artery calcium*/ cálcio das artérias coronárias
CCL2: *C-C motif chemokine ligand 2*
cclMT: *common carotid intima-media thickness*
CCS: *Coronary calcium score*
CD: *cluster of differentiation*
CDAI: *clinical disease activity index*
cDNA: *complementary DNA*
CI: *confidence interval*
COMP: *cartilage oligomeric matrix protein*
CPM: cintigrafia de perfusão miocárdica
CPT1A: *carnitine palmitoyltransferase 1A*
CREB: *cAMP response element-binding protein*
csDMARDs: *conventional synthetic DMARDs*
CRP: C-reactive protein
CTX: *carboxy-terminal cross-linking telopeptide*
CV: cardiovascular
CVDs: *cardiovascular diseases*
CXCL13: *B lymphocyte chemoattractant*
CXCR5: CD185; *C-X-C chemokine receptor type 5*

D

DAS28: *disease activity score using 28 joint count*
DAS28-PCR: DAS28 proteína C reactiva
DAS28-VS: DAS28 velocidade de sedimentação
DCVs: doenças cardiovasculares
DKK: Dickkopf
DMARDs: *disease-modifying antirheumatic drugs*
DMO: densidade mineral óssea
DP: desvio padrão
DXA: *dual-energy X-ray absorptiometry*/ absorciometria por duplo feixe de raios-X

E

EGF: *epidermal growth factor*

ESC: *European Society of Cardiology*

EUA: Estados Unidos da América

EULAR: *European League Against Rheumatism*

F

Fc: *fragment crystallizable*

FcγRIV: *intermediate-affinity activating receptor for IgG2a and IgG2b (CD16.2/mouse homolog of human Fc FcγRIIIA)*

FCRL3: *Fc receptor like 3*

FGF: *fibroblast growth factor*

FMD: *flow-mediated vasodilation*

FR: *fator reumatoide*

FRAX: *fracture risk assessment tool*

FRS: *Framingham risk score*

FMD: *flow-mediated vasodilation*

G

GLA: *gamma-carboxyglutamic domain*

GM-CSF: *fator estimulador de colônias de granulócitos-monócitos*

GRZB: *granzima B*

H

HAQ: *health assessment questionnaire disability index*

HDL: *lipoproteína de elevada densidade*

HLA: *human leukocyte antigen*

HLA-DRB: *human leukocyte antigen class II beta chain*

HOMA IR: *homeostasis model assessment*

HR: *hazard ratio*

hTNFtg mice: *transgenic mice that express the human tumor necrosis factor*

Htr1b: *5-hydroxytryptamine receptor 1B*

I

I-A^{b7}: *major histocompatibility complex (MHC) class II molecule linked to murine diabetes*

IC: *intervalo de confiança*

ICAM: *intercellular adhesion molecule*

Ig: *imunoglobulina*

IGF: *insulin-like growth factor*

IL: *interleucina*

IL2RA: *interleukin 2 receptor alpha chain*

IL4R: *interleukin 4 receptor*

IL1Ra: *interleukin 1 receptor antagonist*

IMC: *índice de massa corporal*

ISRSs: *inibidores seletivos da recaptção da serotonina*

J

JAKs: *Janus kinases*

JSN: *joint space narrowing/estreitamento da interlinha articular*

K

K/BxN mice: *mice expressing both the T cell receptor (TCR) transgene KRN and the major histocompatibility complex (MHC) class II molecule I-A^{g7}*

KREMEN1: *kringle containing transmembrane protein 1*

L

LDL: *lipoproteína de baixa densidade*

LDLR: *recetor de lipoproteína de baixa densidade*

LEF: *lymphoid enhancer binding factor*

LRP: *low-density lipoprotein receptor related proteins*

M

MCP-1: *monocyte chemoattractant protein 1*

microARNs: *micro-ácidos ribonucleicos*

micro-TC: *micro-tomografia computadorizada*

MHC: *major histocompatibility complex*

MMP: *matrix metalloproteinase*

MPS: *myocardial perfusion scintigraphy*

MSCs: *stem cells mesenquimatosas*

MTL5: *metallothionein-like 5*

N

NF- κ B: *nuclear factor kappa B*

NSSs: *níveis séricos de serotonina*

NT-proBNP: *N-terminal pro b-type natriuretic peptide*

O

OMERACT: *Outcome Measures in Rheumatology*

OMS: *Organização Mundial de Saúde*

OPG: *osteoprotegerin/ osteoprotegerina*

OPPG: *síndrome de osteoporose e pseudoglioma*

OR: *odds ratio*

P

PAD: *peptidyl arginine deiminase*

PADI4: *peptidyl arginine deiminase type 4*

PCR: *proteína C reativa*

PET: *tomografia de emissão de positrões*

PTH: *paratormona*

PTPN22: *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (lymphoid)*

P1NP: *propeptídeo N-terminal de procólágeno do tipo I*

PWV: *pulse-wave velocity*

PYD: *piridinolina*

Q

QRISK2: *QRISK2 cardiovascular disease risk score*

R

RA: *rheumatoid arthritis*

RANK: *receptor activator of nuclear factor- κ B*

RANKL: *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand/ ligando do recetor ativador do fator nuclear- κ B*

RCT: ensaio randomizado (aleatorizado) e controlado

RM: ressonância magnética

RR: risco relativo

RRS: *Reynolds risk score*

Runx2: *runt-related transcription factor 2*

S

SCC: score de cálcio coronário

SCORE: *systematic coronary risk evaluation*

SD: *standard deviation*

SDAI: *simplified disease activity index*

SDS: *summed difference score*

SFRPs: *secreted frizzled related proteins*

SHS: modified Sharp/van der Heijde Score/ score de Sharp modificado por van der Heijde

sIL6R: *soluble interleukin-6 receptor*

SMADs: *transcription factors that transduce extracellular TGF- β superfamily ligand signaling*

Smurf: *ubiquitin-protein ligase*

SNC: sistema nervoso central

SNPs: *single nucleotide polymorphisms*/polimorfismos genéticos de um único nucleotídeo

SOST: gene que codifica a esclerostina

SPAG16: *sperm-associated antigen 16*

SPECT: *single photon emission-computed tomography*

SSLs: *serum serotonin levels*

SSS: *summed stress score*

STAT: *signal transducers and activators of transcription*

T

TC: tomografia computadorizada

TCF: *T-cell transcription factor*

TCR: *T cell receptor*

TGF- β : *transforming growth factor beta*

Th: *T helper*

TIMP1: *tissue inhibitor of metalloproteinases 1*

TNFAIP3-OLIG3: *tumour necrosis factor alpha-induced protein 3 - oligodendrocyte lineage transcription factor 3*

TNF α : fator de necrose tumoral alfa

Tph: *tryptophan hydroxylase*

TRAF: *TNF receptor associated factor*

TRAP: *tartrate resistant acid phosphatase*

Treg: células T reguladoras

V

VCAM: *vascular cell adhesion molecule*

VEGF: *vascular endothelial growth factor*

VS: velocidade de sedimentação

Wnt: *wingless*

AGRADECIMENTOS	19
GLOSSÁRIO	21
ÍNDICE	27
RESUMO	31
ABSTRACT	35
INTRODUÇÃO	39
1. Artrite reumatoide	39
1.1. Epidemiologia e etiologia	39
1.2. Fisiopatologia	41
1.2.1. A resposta auto-imune	41
1.2.2. A inflamação	42
1.3. Diagnóstico	43
1.4. Avaliação da doença e objetivos terapêuticos	43
1.5. Estratégia terapêutica	45
1.6. Morbidade cardiovascular	46
1.6.1. Epidemiologia	46
1.6.2. Fatores de risco cardiovascular tradicionais	46
1.6.3. O paradoxo lipídico	47
1.6.4. Fatores de risco cardiovascular não-tradicionais	49
1.7. Avaliação do risco cardiovascular	51
1.7.1. Scores clínicos de risco cardiovascular	51
1.7.2. Imagiologia cardiovascular não-invasiva	52
1.8. Dano osteo-articular	54
1.8.1. Reabsorção óssea	56
1.8.2. Osteoclastogénese mediada por anticorpos	58
1.8.3. Regulação da diferenciação osteoblástica	59
1.8.4. Reparação das erosões ósseas	61
1.8.5. Inibição da função osteoblástica	62
2. Gene do LRP5 e o osso	64
2.1. LRP5 e doenças ósseas monogénicas	65
2.2. LRP5 e osteoporose	66
2.3. LRP5, densidade mineral óssea e risco de fratura na população geral	67
2.4. Aspectos funcionais do LRP5	68

3. Serotonina e osso	70
OBJECTIVOS	73
1. Relativamente ao dano cardiovascular na artrite reumatoide	73
2. Relativamente ao dano ósseo na artrite reumatoide	74
PROJETO DE INVESTIGAÇÃO – METODOLOGIA EXPERIMENTAL	75
1. Material e métodos	75
2. População	75
3. Avaliação laboratorial	76
4. Genotipagem	77
5. Avaliação radiográfica	79
6. Avaliação da densidade mineral óssea	79
7. Avaliação cardiovascular	79
7.1. Cintigrafia de perfusão miocárdica	79
7.2. Score de cálcio coronário	80
8. Metodologia estatística	81
RESULTADOS	83
1. Características gerais da população incluída nos trabalhos publicados/submetidos para publicação	83
2. Relativamente ao dano cardiovascular na artrite reumatoide	87
2.1. Myocardial perfusion in rheumatoid arthritis patients: associations with traditional risk factors and novel biomarkers. Biomed Res Int. 2017;2017:6509754.	87
2.2. Coronary artery calcium score in rheumatoid arthritis patients: associations with apolipoproteins and disease biomarkers (under review).	99
3. Relativamente ao dano ósseo na artrite reumatoide	137
3.1. LRP5 gene polymorphisms and radiographic joint damage in rheumatoid arthritis patients (under review).	137
3.2. Serum serotonin levels and bone in rheumatoid arthritis patients. Rheumatol Int. 2017 Nov;37(11):1891-1898.	173
DISCUSSÃO	187
1. Artrite reumatoide e dano vascular	187
1.1. Aterosclerose e osteoporose	187

1.1.1. Frequências e associações epidemiológicas	187
1.1.2. Fatores de risco para doença aterosclerótica em doentes com artrite reumatoide	189
1.1.3. Mecanismos fisiopatológicos envolvidos na interação osteoporose-aterosclerose em doentes com artrite reumatoide	190
1.1.3.1. Interleucinas pro-inflamatórias e pró-reabsortivas	190
1.1.3.2. Vias de metabolismo ósseo	191
1.1.3.3. Stresse oxidativo e LDL oxidadas	194
1.1.3.4. Isquemia intra-óssea	195
1.2. Avaliação do risco de doença cardiovascular na artrite reumatoide	196
1.2.1. Papel da imagiologia cardiovascular	199
1.2.2. Papel dos biomarcadores	204
1.2.3. Implementação de estratégias de avaliação de risco cardiovascular em doentes reumatoides	205
2. Dano articular na artrite reumatoide	206
2.1. Progressão radiográfica	206
2.2. Biomarcadores de gravidade de doença	209
2.2.1. Biomarcadores genéticos	209
2.2.1.1. Marcadores genéticos de suscetibilidade	211
2.2.1.2. Marcadores genéticos de inflamação	213
2.2.1.3. Marcadores genéticos do osso e cartilagem	215
2.2.2. Biomarcadores serológicos	221
2.2.3. Biomarcadores imagiológicos	223
2.3. Medicina personalizada	226
3. Densidade mineral óssea na artrite reumatoide	226
 CONCLUSÃO	 231
 BIBLIOGRAFIA	 235

RESUMO

Na artrite reumatoide, os danos cardiovascular e ósseo são importantes fontes de morbidade, incapacidade e mortalidade. No passado, a osteoporose e a aterosclerose eram consideradas duas patologias, independentes uma da outra. No entanto, hoje em dia, existe uma evidência crescente duma ligação epidemiológica e fisiopatológica entre as duas doenças.

As doenças cardiovasculares (DCVs) são uma das principais causas de morte em doentes com artrite reumatoide e a avaliação do risco cardiovascular (CV) nestes doentes ainda é uma questão por esclarecer. Nesta tese, pesquisámos a presença de isquemia miocárdica silenciosa em doentes com artrite reumatoide estabelecida, e a sua associação a múltiplas variáveis antropométricas e clínicas, ao peptídeo natriurético cerebral (BNP) e a biomarcadores ósseos e de ateroma [osteoprotegerina (OPG) e ligando do recetor ativador do fator nuclear-kappa B (RANKL), assim como a sua razão; dickkopf-1 (DKK-1) e esclerostina, inibidores conhecidos da via Wnt/ β -catenina canónica]. O score de cálcio coronário (SCC), avaliado por tomografia computadorizada, tem sido associado ao prognóstico da artrite reumatoide. Neste trabalho, avaliamos também o SCC em doentes com artrite reumatoide e investigámos as suas associações com os mesmos parâmetros que escolhemos para o estudo de cintigrafia de perfusão miocárdica, acrescentando as avaliações do dano ósseo.

A cintigrafia de perfusão miocárdica sob stresse com adenosina revelou para os 189 doentes com artrite reumatoide, assintomáticos para DCV, revelou defeitos de perfusão miocárdica (*summed stress score*, $SSS \geq 4$) em 47 (25%) doentes, defeitos ligeiros em 35 (18,5%), moderados em 10 (5,3%) e graves em 2 (1%). Os defeitos apresentaram um *summed difference score* (SDS) médio de $4,1 \pm 3$ e uma extensão no stresse de $2,5 \pm 3,6\%$, tendo sido reversíveis em repouso em 31 (16%) casos. A fração de ejeção do ventrículo esquerdo foi inferior a 45% em 9 (4,76%) doentes, apresentando-se com um valor médio de $63,7 \pm 9,8\%$. Os defeitos de perfusão eram únicos (25/47, 53%) ou múltiplos (22/47, 47%), sem distribuição preferencial pelos diferentes territórios coronários. Os defeitos de perfusão associaram-se a valores de $BNP \geq 100 \text{ pg/mL}$ [odds ratio (OR)=5,68; intervalo de confiança (IC) 95%: 2,038-15,830], ao quarto quartil do logaritmo da razão OPG/RANKL (OR=2,88; IC 95%: 1,091-7,622) e a valores de $DKK-1 \geq 133 \text{ pmol/L}$ (OR=2,69; IC 95%: 1,058-6,840). Associações similares foram confirmadas, quer nos doentes com $PCR > 3 \text{ mg/L}$, quer nos com valores $\leq 3 \text{ mg/L}$. Não se encontraram associações com a maioria dos fatores de risco CV tradicionais nem com variáveis da doença. Assim, os nossos resultados sustentaram a hipótese de que a cintigrafia de perfusão miocárdica poderia revelar uma disfunção CV subclínica, apoiaram a utilidade do doseamento do BNP como instrumento de rastreio dos doentes e colocaram em perspectiva o potencial interesse de utilizar outras abordagens complementares na avaliação do risco CV em doentes com artrite reumatoide.

Além disso, em 78 doentes com artrite reumatoide, também assintomáticos para DCV, tivemos a oportunidade de medir o cálcio das artérias coronárias. Valores de SCC normais ou quase normais (≤ 10) estiveram presentes em 64% dos doentes. O cálcio das artérias coronárias foi quantificado em 41 (53%) doentes [$1 < \text{SCC} \leq 10$: 13 (17%); $10 < \text{SCC} \leq 100$: 17 (22%); $100 < \text{SCC} \leq 400$: 9 (11%); $\text{SCC} > 400$: 2 (3%)]. O SCC foi de $46,133 \pm 122,892$ (média \pm DP). A presença de um $\text{SCC} > 10$ associou-se significativamente aos fatores de risco CV [idade (OR=1,076; $p=0,004$), índice de massa corporal (IMC) $\geq 30 \text{ Kg/m}^2$ (OR=0,072; $p=0,017$), HDL (OR=0,016; $p=0,015$), razão LDL/HDL (OR=1,767; $p=0,045$), apolipoproteína A1 (ApoA1) (OR=0,970; $p=0,009$); razão ApoB/ApoA1 (OR=28,657; $p=0,011$), homocisteína (OR=1,176; $p=0,038$), uso de estatinas (OR=3,413; $p=0,03$), diabetes (OR=13,429; $p=0,019$) e uso de antidiabéticos (OR=13,364; $p=0,020$)], atividade da doença [proteína C reativa (PCR) (OR=1,046; $p=0,022$), DAS (4v) (OR=1,584; $p=0,019$), DAS (4v, PCR) (OR=1,558; $p=0,022$) e score de erosões do score de Sharp/van der Heijde modificado (SHS) (OR= 1,012; $p=0,018$)], biomarcadores séricos [DKK-1 (OR=1,014; $p=0,017$) e OPG (OR=1,381; $p=0,031$)], densidade mineral óssea (DMO) [femoral (OR=0,012; $p=0,014$) e lombar (OR=0,009; $p=0,006$)] e osteoporose (OR=5,476; $p=0,012$). Após ajuste para a idade, o sexo e o IMC, só se mantiveram significativas as associações com a ApoA1, a razão ApoB/ApoA1, o uso de estatinas, a PCR, o DAS (4v), o DAS (4v, PCR) e o DKK-1. O nosso trabalho reforçou a hipótese de que, na artrite reumatoide, o SCC pode ser uma ferramenta útil na avaliação do risco CV, sendo particularmente valioso em doentes pior controlados e com um perfil específico de lipoproteínas. De acordo com os nossos dados, poderíamos também sugerir, para além da avaliação periódica da atividade inflamatória da doença, uma abordagem com recurso a múltiplos biomarcadores simultaneamente (um kit laboratorial, por exemplo) para a avaliação do risco CV em doentes com artrite reumatoide, quantificando os níveis séricos de PCR, BNP, ApoB, ApoA1, DKK-1, OPG e RANKL (e calculando as razões entre eles já acima mencionadas). Por outro lado, a artrite reumatoide é o protótipo de artrite inflamatória, que afeta, simultaneamente, o osso articular e osso periarticular, bem como os ossos do esqueleto axial e apendicular, causando aqui osteopenia/osteoporose. A artrite reumatoide também se caracteriza por um aumento da reabsorção óssea e uma inibição da formação óssea. As erosões ósseas são típicas e não sofrem reparação. Além disso, sabe-se que a função osteoblástica é regulada pela via Wnt/ β -catenina canónica, que é criticamente regulada por *low-density lipoprotein receptor related protein 5* (LRP5), e que a destruição articular na artrite reumatoide e a DMO são parcialmente herdadas. Num terceiro trabalho desta tese, estudámos a associação destas duas últimas características fenotípicas com três polimorfismos genéticos de um único nucleotídeo (SNPs) do LRP5 e com os biomarcadores ósseos séricos. Além disso, na literatura, estudos recentes demonstraram que a serotonina circulante tem um papel regulador da

osteoblastogénese, inibindo a formação óssea, tendo também sido reportados níveis elevados de serotonina em doentes com artrite reumatoide *versus* controlos. Dadas as inúmeras controvérsias acerca deste eixo intestino-osso, para além da falta de estudos em humanos, medimos os níveis séricos de serotonina (NSSs) na nossa amostra de doentes com artrite reumatoide e fomos relacioná-los com as variáveis antropométricas, os parâmetros da doença, os biomarcadores ósseos séricos e a DMO, avaliada em várias localizações anatómicas.

Relativamente aos 208 doentes com artrite reumatoide, foram colhidos todos os dados antropométricos e clínicos, assim como amostras de sangue periférico para doseamento de biomarcadores ósseos e de ateroma. Além disso, procedeu-se à genotipagem do LRP5. As radiografias de mãos e pés foram avaliadas quantitativamente (utilizando-se o SHS). A DMO da coluna lombar, do fémur proximal total esquerdo e da mão esquerda foram avaliadas por absorciometria de raios-X de energia dupla (DXA). Na nossa amostra, as frequências genótípicas foram: 88,5% GG, 11,1% AG e 0,005% AA para o p.V667M do LRP5; 68,8% CC, 26,9% TC e 4,3% TT para o p.N740N do LRP5; 72,1% CC, 24,5% TC e 3,4% TT para o p.A1330V do LRP5. Os genótipos TT para os SNPs p.A1330V e p.N740N do LRP5 foram associados ao SHS total, ao *score* de erosão e ao *score* de erosão das mãos. Além disso, também foram encontradas uma associação com o *score* total das mãos e o *score* de estreitamento da interlinha articular (JSN) dos pés, para aqueles SNPs, respetivamente; todas as associações foram independentes da idade ao diagnóstico da artrite reumatoide e do índice do Questionário de Avaliação de Saúde (HAQ; função física). O genótipo AG para o SNP p.V667M do LRP5 foi associado ao *score* de JSN das mãos, independentemente da idade ao diagnóstico da artrite reumatoide e do HAQ, e aos níveis séricos de esclerostina, independentemente da idade ao diagnóstico da artrite reumatoide, do HAQ e da duração do tratamento de osteoporose. O genótipo TC para o SNP p.N740N do LRP5 foi associado à DMO do fémur proximal total esquerdo, independentemente da idade ao diagnóstico da artrite reumatoide, do HAQ, do IMC e do tempo de tratamento da osteoporose. Em suma, encontrámos associações significativas entre os três SNPs do LRP5 (p.A1330V, p.N740N e p.V667M) e a gravidade do dano radiográfico, reforçando a evidência de hereditariedade da destruição óssea na artrite reumatoide. Também replicamos a evidência do LRP5 como biomarcador genético para a gravidade da destruição articular radiográfica na artrite reumatoide, conforme tinha sido relatado anteriormente na coorte de Leiden.

Em termos de massa óssea e serotonina, os NSSs apresentaram uma associação inversa com o IMC nas mulheres com artrite reumatoide ($r=-0,218$; $p=0,005$), independentemente da exposição a fármacos biológicos e/ou a bisfosfonatos. Entre os naïves de fármacos biológicos, houve uma associação inversa entre os NSSs e a OPG em mulheres com artrite reumatoide ($r=-0,260$; $p=0,022$). O *beta-carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen* (β -CTX) e o

DKK-1 séricos correlacionaram-se fortemente com os NSSs nos homens com artrite reumatoide não tratados com bisfosfonatos ($r=0,590$; $p<0,001$ / $r=0,387$; $p=0,031$, respectivamente). Houve também uma associação inversa entre os NSSs e a esclerostina em homens com artrite reumatoide ($r=-0,374$; $p<0,05$), sendo esta associação mais forte entre os homens naïves de fármacos biológicos ou naïves de bisfosfonatos. Em modelos brutos, os NSSs apresentaram-se como um preditor negativo da DMO do fémur proximal total nas mulheres com artrite reumatoide, bem como nas mulheres pós-menopáusicas com artrite reumatoide. Após ajuste para o IMC, a duração da doença e os anos de menopausa, os NSSs permaneceram como preditores negativos significativos da DMO do fémur proximal total apenas nas mulheres pós-menopáusicas com artrite reumatoide. Os nossos dados reforçam, para a serotonina circulante, um papel regulador, apesar de fraco, da massa óssea em doentes com artrite reumatoide, com algumas diferenças em termos de género e de locais anatómicos. Os nossos achados em termos de biomarcadores ósseos levaram-nos a questionar a suposta influência exclusiva da serotonina na formação óssea.

A redução da morbimortalidade da artrite reumatoide exige a compreensão dos mecanismos envolvidos nas diferentes manifestações do dano multissistémico. Neste trabalho foram exploradas associações de mediadores da via wnt/LRP5/ β -catenina com a doença cardiovascular e a doença óssea, o impacto de fatores genéticos desta via na gravidade do dano articular e a importância da serotonina circulante no osso. As implicações futuras de alguns dos resultados obtidos dependerão da sua replicação noutras séries ou de resultados de estudos de intervenção farmacológica com impacto nesta mesma via de sinalização.

ABSTRACT

In rheumatoid arthritis (RA), cardiovascular damage and bone damage are important sources of morbidity, disability, and mortality. In the past, osteoporosis and atherosclerosis were long viewed as independent of each other. However, nowadays, there is a growing, epidemiological and pathophysiological link between both diseases.

Cardiovascular diseases (CVDs) are a major cause of death in RA patients and the cardiovascular (CV) risk management of these patients is still an unsolved issue. In this thesis, we analysed, in established RA patients, the presence of silent myocardial ischemia and its association with antropometric and clinical variables, brain natriuretic peptide (BNP) and bone and atheroma biomarkers [osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) ratio, as well as their ratio; dickkopf-1 (DKK-1) and sclerostin, known inhibitors of the canonical Wnt/ β -catenin pathway]. Coronary calcium score (CCS), assessed by computed tomography, has been associated with RA prognosis. In this work, we also evaluated the CCS in RA patients and determined their associations with the same parameters as for the myocardial perfusion scintigraphy (MPS) study, adding the assessment of bone damage.

In 189 RA patients, asymptomatic for CVD, submitted to MPS under adenosine stress, MPS showed myocardial perfusion defects (*summed stress score*, $SSS \geq 4$) in 47 (25%) patients, mild defects in 35 (18.5%), moderate in 10 (5.3%), and severe in 2 (1%). The defects had a mean *summed difference score* (SDS) of 4.1 ± 3 and stress extension of $2.5 \pm 3.6\%$ and were reversible at rest in 31 (16%) cases. Left ventricle ejection fraction was inferior to 45% in 9 (4.76%) patients with a mean value of $63.7 \pm 9.8\%$. The perfusion defects were either unique (25/47, 53%) or multiple (22/47, 47%), with no preferential distribution at different coronary territories. Perfusion defects associated with $BNP \geq 100 \text{ pg/mL}$ [odds ratio (OR)=5.68; 95% confidence interval (CI): 2.038-15.830], fourth log OPG/RANKL ratio quartile (OR=2.88; 95% CI: 1.091-7.622) and $DKK-1 \geq 133 \text{ pmol/L}$ (OR=2.69; 95% CI: 1.058-6.840). Similar associations were confirmed in patients with $CRP > \text{ or } \leq 3 \text{ mg/L}$. No relationships were found with the majority of traditional CV risk factors nor with disease variables. Our results sustained the hypothesis that MPS could reveal subclinical CV dysfunction, supported the utility of BNP measurements as a screening tool, and put into perspective the potential usefulness of complementary approaches in CV risk assessment in RA patients.

In addition, in 78 RA patients, also asymptomatic for CVD, we had the opportunity to measure the coronary artery calcium. Normal or near normal CCS values (≤ 10) were present in 64% of the patients. The coronary artery calcium was quantified in 41 (53%) patients [$1 < \text{CCS} \leq 10$: 13 (17%); $10 < \text{CCS} \leq 100$: 17 (22%); $100 < \text{CCS} \leq 400$: 9 (11%); $\text{CCS} > 400$: 2 (3%)]. CCS value was 46.133 ± 122.892 (mean \pm SD). $\text{CCS} > 10$ was significantly associated to CV risk factors [age

(OR=1.076; p=0.004), body mass index (BMI) ≥ 30 Kg/m² (OR=0.072; p=0.017), HDL (OR=0.016; p=0.015), LDL/HDL ratio (OR=1.767; p=0.045), apolipoprotein A1 (ApoA1) (OR=0.970; p=0.009), ApoB/ApoA1 ratio (OR=28.657; p=0.011), homocysteine (OR=1.176; p=0.038), statins use (OR=3.413; p=0.03), diabetes (OR=13.429; p=0.019) and antidiabetics use (OR=13.364; p=0.020)], disease activity [C reactive-protein (CRP) (OR=1.046; p=0.022), DAS(4v) (OR=1.584; p=0.019), DAS(4v, CRP) (OR=1.558; p=0.022) and erosion score of the modified Sharp/van der Heijde Score (SHS) (OR=1.012; p=0.018)], circulating biomarkers [(DKK-1 (OR=1.014; p=0.017) and OPG (OR=1.381; p=0.031)], bone mineral density (BMD) [femoral (OR=0.012; p=0.014) and lumbar spine (OR=0.009; p=0.006)] and osteoporosis (OR=5.476; p=0.012). After adjustment for age, gender and BMI, significant associations were maintained with ApoA1, ApoB/ApoA1 ratio, statins use, CRP, DAS(4v), DAS(4v, CRP) and DKK-1. Our work reinforced the hypothesis that, in RA, CCS may be a useful tool in CV assessment, particularly valuable in poorer controlled patients with certain lipoprotein profile. According to our data, we could also propose, apart from evaluating periodically the inflammatory activity of the disease, a multi-biomarker approach for the CV risk assessment in RA patients, quantifying the circulating levels of CRP, BNP, ApoA1, ApoB, DKK-1, OPG and RANKL (and calculating the aforementioned ratios).

On the other hand, RA is the prototype of the inflammatory arthritis that affects articular and periarticular bone, as well as bone in the axial and appendicular skeleton, causing osteopenia/osteoporosis. RA is also characterized by an increased bone resorption and an impaired bone formation. Typically, bone erosions appear and do not restore. In addition, osteoblast function is regulated by the canonical Wnt/ β -catenin pathway, critically signalled by the lipoprotein receptor-related protein-5 (LRP5). Since BMD and RA joint destruction are partially inherited, we studied their association with three LRP5 single nucleotide polymorphisms (SNPs) and circulating bone markers. Moreover, a role for circulating serotonin as a regulator of osteoblastogenesis, inhibiting bone formation, has been demonstrated and increased levels of serotonin have been reported in RA patients *versus* controls. Since there are still many controversies about this gut-bone axis addition to a lack of human studies, we measured serum serotonin levels (SSLs) in our sample of RA patients and related these to anthropometric variables, disease parameters, serum bone biomarkers, and BMD assessed at several anatomical sites.

From those 208 patients with RA, anthropometric and clinical data as well as peripheral blood samples for bone and atheroma biomarkers assessment were collected and LRP5 genotyping was performed. Hands and feet x-rays were scored (using SHS). Lumbar spine, total left proximal femur and left hand BMD were assessed by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). In our sample, the genotypic frequencies were: 88.5% GG, 11.1% AG and 0.005% AA for LRP5 V667M

polymorphism; 68.8% CC, 26.9% TC and 4.3% TT for LRP5 N740N polymorphism; 72.1% CC, 24.5% TC and 3.4% TT for LRP5 A1330V polymorphism. The TT genotypes for p.A1330V and p.N740N LRP5 SNPs were associated with total SHS, erosion score and hands erosion score. Additionally, an association was found with hands total score and feet joint space narrowing (JSN) for those SNPs, respectively; all associations were independent of age at RA diagnosis and Health Assessment Questionnaire index (HAQ; physical function). The AG genotype for p.V667M LRP5 SNP was associated with hands JSN score, independently of age at RA diagnosis and HAQ, and with sclerostin, independently of age at RA diagnosis, HAQ and osteoporosis treatment duration. The TC genotype for the p.N740N LRP5 SNP was associated with total left proximal femur BMD, independently of age at RA diagnosis, HAQ, BMI, and osteoporosis treatment duration. In summary, we found significant associations between LRP5 SNPs (p.A1330V, p.N740N and p.V667M) and the severity of radiographic damage, reinforcing the evidence of bone destruction heritability in RA. We also replicated the evidence for LRP5 as a genetic biomarker for the severity of radiographic joint destruction in RA, as previously reported in the Leiden cohort.

In terms of bone mass and serotonin, SSLs were inversely associated with BMI in RA women ($r=-0.218$; $p=0.005$), independent of exposure to biologics and/or bisphosphonates. Among biologic naïves, there was an inverse association between SSLs and OPG in RA women ($r=-0.260$; $p=0.022$). Serum β -CTX and DKK-1 were strongly associated with SSLs in RA men not treated with bisphosphonates ($r=0.590$; $p<0.001$ / $r=0.387$; $p=0.031$, respectively). There was also an inverse association between SSLs and sclerostin in RA men ($r=-0.374$; $p<0.05$), stronger among biologic naïve or bisphosphonates-unexposed RA men. In crude models, SSLs presented as a significant negative predictor of total proximal femur BMD in RA women as well as in postmenopausal RA women. After adjustment for BMI, disease duration, and years of menopause, SSLs remained a significant negative predictor of total proximal femur BMD only in postmenopausal RA women. Our data reinforce a role, despite weak, for circulating serotonin in regulating bone mass in RA patients, with some differences in terms of gender and anatomical sites. Our findings in terms of bone biomarkers led us to question the supposed exclusive influence of serotonin on bone formation.

In order to reduce RA morbidity and mortality, it is required to understand the mechanisms involved in the different manifestations of the multisystemic damage. In this work we investigated associations of Wnt/LRP5/ β -catenin pathway mediators with cardiovascular disease and bone disease, the impact of genetic factors of this pathway on the severity of joint damage and the importance of circulating serotonin in the bone. The future implications of some

of the obtained results will depend on their replication in other series or on the results of pharmacological intervention trials impacting the same signaling pathway.

INTRODUÇÃO

1. Artrite reumatoide

A artrite reumatoide é uma das doenças reumáticas inflamatórias crônicas mais prevalentes, que, ao causar dano na cartilagem e no osso, conduz à incapacidade. Embora envolva primariamente as articulações, ela devia ser considerada uma síndrome, onde se incluíam todas as manifestações extra-articulares, tais como os nódulos reumatoides, o atingimento pulmonar específico da doença, a vasculite reumatoide assim como outras comorbilidades sistêmicas (1). A artrite reumatoide representa um peso socioeconómico considerável, quer para o indivíduo, quer para a sociedade (2). Para o indivíduo, o dano musculoesquelético e o consequente compromisso funcional, a perda de qualidade de vida e a acumulação de comorbilidades aumentam progressivamente com a evolução da doença reumatoide (3). Para a sociedade, além dos custos diretos em Saúde, a carga advém fundamentalmente da incapacidade funcional, que se reflete na perda da capacidade de trabalho e na redução da participação social por parte do indivíduo doente (4).

1.1. Epidemiologia e etiologia

A artrite reumatoide tem uma incidência estimada entre 0,5% a 1%, com uma aparente redução de norte para sul no hemisfério norte e dos meios rurais para os meios urbanos (5, 6). O estudo EpiReumaPt, o maior e mais recente estudo nacional de prevalência das doenças reumáticas em Portugal, envolvendo 10661 adultos selecionados de forma aleatória, permitiu aferir de forma rigorosa uma prevalência para a artrite reumatoide de 0,7% (IC 95%: 0,5% a 0,9%) (7).

Na patogénese da doença parecem estar envolvidos fatores genéticos, epigenéticos e ambientais.

A presença de história familiar de artrite reumatoide aumenta entre 3 a 5 vezes a probabilidade de vir a desenvolver a doença, o que, associado às elevadas taxas de concordância entre gémeos, consubstanciam a implicação de fatores genéticos na patogénese da doença (8). A heritabilidade da artrite reumatoide seropositiva encontra-se estimada entre 40 a 65%, sendo um pouco menor na artrite reumatoide seronegativa (20%) (9, 10). Os estudos genéticos mais recentes, nomeadamente os estudos de associação de todo o genoma e com recurso a *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), vieram confirmar mais de uma centena de *loci* de risco associados à artrite reumatoide, a maioria deles implicados em mecanismos imunológicos (1). Os alelos do *human leukocyte antigen* (HLA), nomeadamente o HLA-DRB1, são os *loci* de risco dominantes e caracterizam-se por codificarem sequências de aminoácidos comuns ao nível do local de ligação aos peptídeos, comumente designadas de epítopo partilhado (11). Alguns destes genótipos do HLA associam-se a doença reumatoide mais erosiva e com uma mortalidade mais

elevada (12). A presença do epítipo partilhado está ainda associada à seropositividade para os auto-anticorpos anti-peptídeos citrulinados cíclicos (ACPAs) e anti-IgG [fator reumatoide (FR)], apresentando uma associação mais fraca com a artrite reumatoide seronegativa (12). Estes últimos auto-anticorpos estão presentes na altura do diagnóstico em 50 a 70% dos doentes e mantêm-se estáveis ao longo do curso da doença (13, 14). Outros *loci*, isoladamente, parecem contribuir menos para o risco genético de desenvolver artrite reumatoide mas podem ter efeitos cumulativos, como é o caso das alterações nos genes das vias da co-estimulação [por exemplo, *cluster of differentiation* (CD)28 e CD40], da sinalização por citocinas, da ativação dos recetores dos linfócitos [por exemplo, o *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (lymphoid)* (PTPN22)] ou da ativação da imunidade inata (1).

A epigenética também contribui para a patogénese da artrite reumatoide, integrando as influências genéticas e ambientais. Um estudo recente de associação de todo o epigenoma identificou 10 posições diferentemente metiladas que se associam ao risco genético de desenvolver a doença (15). Na realidade, alterações na acetilação das histonas e na metilação do ácido desoxirribonucleico (ADN) parecem regular funcionalmente os linfócitos e os fibroblastos da sinovial (16). Adicionalmente, sabe-se que muitos micro-ácidos ribonucleicos (miARNs) são importantes reguladores dos linfócitos, dos macrófagos e dos fibroblastos sinoviais (por exemplo, os miARNs miR146a ou miR155), ligando-se ao ácido ribonucleico mensageiro (ARNm) e promovendo a sua degradação (17).

O aparecimento de artrite reumatoide também está associado a fatores de risco ambientais, nomeadamente o tabaco (18, 19), o nível socioeconómico baixo e a escolaridade baixa (20). A doença periodontal constitui um outro fator de risco ambiental (21). A explicação parece residir na *Porphyromonas gingivalis*, um agente frequente de periodontite, que ao exprimir endogenamente a *peptidyl arginine deiminase type 4* (PADI4), promove a conversão dos resíduos de arginina em citrulina, conduzindo a uma citrulinização aberrante dos peptídeos, provocando a perda consequente de tolerância aos peptídeos citrulinados (21). De igual forma, a disbiose gastrointestinal parece estar implicada na artrite reumatoide inicial (22). Um estudo recente permitiu detetar alterações nas populações microbianas oral, salivar e gastrointestinal, que parecem estar associadas ao valor da proteína C reativa (PCR) e à positividade para os ACPAs em doentes reumatóides (23). A terapêutica com *disease-modifying antirheumatic drugs* (DMARDs) parece alterar essas mesmas populações microbianas.

1.2. Fisiopatologia

1.2.1. A resposta auto-imune

Na artrite reumatoide a seropositividade está associada a sintomas mais graves, a maiores danos nas articulações e a um aumento da mortalidade (24). Estes factos devem-se à formação de imunocomplexos entre os ACPAs e os antígenos contendo resíduos de citrulina, com subsequente ligação do FR a estes mesmos imunocomplexos, conduzindo a uma extensa ativação do complemento (25). Os ACPAs podem ligar-se aos resíduos de citrulina de muitas proteínas do próprio, tais como a vimentina, a α -enolase, a fibronectina, o fibrinogénio, as histonas e o colagénio tipo II (26, 27). O pulmão é o órgão candidato onde pode ocorrer a ativação destas respostas auto-imunes, o que é consistente com o papel do tabagismo na artrite reumatoide e com a presença de peptídeos citrulinados comuns na histologia de biópsias do pulmão e da sinovial (28). Os ACPAs podem ser detetados em circulação até 10 anos antes do diagnóstico da doença numa fase designada de pré-artrite reumatoide (29). Ao longo do tempo, a concentração e a diversidade dos epítomos dos ACPAs vão aumentando, assim como as concentrações séricas de citocinas. Estas últimas aumentam particularmente antes do início do envolvimento articular. Os ACPAs, que podem ser de vários isotipos (IgG, IgA ou IgM), são indicativos de ativação das células T e apresentam uma glicosilação alterada que lhes confere vantagem na ligação ao antígeno citrulinado e ao recetor *fragment crystallizable* (Fc) (30, 31). As células B produtoras de ACPAs estão presentes, quer na sinovial, quer em circulação (30, 32). Adicionalmente, os próprios ACPAs podem ser patogénicos, promovendo a perda de osso através de diversos mecanismos: ativação dos macrófagos (por exemplo, ligando-se aos *Toll-like receptors* por intermédio do antígeno a eles ligado, ou pela ligação ao recetor Fc, ou por ambos); ativação dos osteoclastos através da formação de imunocomplexos e ligação ao recetor Fc; ligação à vimentina citrulinada da membrana celular (33). Sob terapêuticas eficazes, as concentrações de FR e ACPAs diminuem, embora, raramente, os doentes fiquem seronegativos para os ACPAs. Pelo contrário, o título de FR pode reduzir significativamente e os doentes tornarem-se seronegativos para o FR (34). Também foram identificados auto-anticorpos anti-peptídeos carbamílicos (anti-Carp) e anti-peptídeos acetilados em doentes com artrite reumatoide (35). Outros auto-anticorpos adicionais, dirigidos contra outras modificações pós-tradução das proteínas, poderão vir a ser identificados no futuro. O FR está mais diretamente envolvido em mecanismos de ativação dos macrófagos e na indução da ativação de citocinas do que os ACPAs (25, 36). Por outro lado, sabe-se menos acerca do papel das células T nestes processos (37). Assim, em doentes com artrite reumatoide precoce encontraram-se números elevados de células T-*helper*-1 (Th1) circulantes específicas da citrulina (38), mas desconhece-se a sua contribuição na génese da auto-imunidade. Também em doentes com artrite reumatoide

precoce, a histologia dos gânglios linfáticos sugere a presença de ativação de células T longe da sinovial (39).

1.2.2. A inflamação

Nos doentes com artrite reumatoide, a tumefação articular reflete a inflamação da membrana sinovial, resultante da ativação imune. Em termos de composição celular, a sinovite na artrite reumatoide inclui células da imunidade inata (por exemplo, monócitos, células dendríticas, mastócitos e células linfóides inatas) e células da imunidade adaptativa [por exemplo, células Th1 e Th17, células B, plasmablastos e plasmócitos]. Adicionalmente, verifica-se uma resposta tecidual responsável pela destruição articular: os fibroblastos da sinovial adquirem um fenótipo agressivo, inflamatório, invasivo e regulador da matriz; também ocorre uma estimulação do catabolismo dos condrócitos e da osteoclastogénese na sinovial (40, 41).

Por outro lado, em doentes com artrite reumatoide, análises moleculares detalhadas (com recurso à transcriptómica) de biópsias eco-guiadas das pequenas articulações sugerem que possam existir 3 subtipos sinoviais distintos (mielóide-dominante, linfocítico-dominante e fibróide-dominante) e que estes podem ter implicações terapêuticas distintas (42).

Na artrite reumatoide, o ambiente inflamatório na sinovial é regulado por uma rede complexa de citocinas e quimiocinas. Os estudos clínicos de intervenção farmacológica dos últimos 10 a 15 anos demonstraram claramente que o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), a interleucina 6 (IL6) e, provavelmente, o fator estimulador de colónias de granulócitos-monócitos (GM-CSF) são essenciais para o processo fisiopatológico (43). As citocinas e quimiocinas levam à indução e/ou agravamento da resposta inflamatória, ativando as células endoteliais e atraindo mais células imunitárias, que se vão acumulando no compartimento sinovial. Os fibroblastos ativados, juntamente com as células T e as células B ativadas, acumuladas na sinovial, e os monócitos e os macrófagos, desencadeiam o desenvolvimento dos osteoclastos por intermédio da interação do *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand* (RANKL), que é expresso pelas células T, células B e fibroblastos, com o seu recetor (*receptor activator of nuclear factor- κ B*; RANK), que é expresso, por sua vez, nos macrófagos, células dendríticas e pré-osteoclastos (44). Consequentemente, surgem as erosões ósseas, tipicamente na junção entre a cartilagem hialina e a inserção da membrana sinovial no perióstio e osso, designada por área desnuda do osso. A cartilagem é danificada em consequência dum aumento do catabolismo dos condrócitos após a sua estimulação por citocinas. A matriz cartilaginosa é degradada pelas metaloproteinases da matriz e outras enzimas (45).

1.3. Diagnóstico

O doente com artrite reumatoide apresenta-se com queixas de dor e tumefação nas articulações, de início recente, acompanhadas de rigidez matinal das mesmas e anomalias nos testes laboratoriais [PCR e velocidade sedimentação (VS) elevadas]. Contudo, esta apresentação clínica não é específica da artrite reumatoide, sendo comum a muitos outros tipos de artrite. Na realidade, não existem critérios diagnósticos para a artrite reumatoide e o diagnóstico é muitas vezes suportado pelos critérios de classificação da doença. Estes últimos não foram estabelecidos para serem utilizados ao nível do doente individual, mas sim para maximizar a homogeneidade das populações de doentes no contexto de estudos científicos (1).

Os critérios mais recentes de classificação do *American College of Rheumatology* (ACR) para artrite reumatoide (46), de 2010, foram criados com o intuito de eliminar algumas deficiências dos antigos critérios [de 1987 (47)], nomeadamente, a inclusão de características associadas a cronicidade e/ou mau prognóstico, como a presença de erosões radiográficas e de nódulos reumatoides (48). Os novos critérios de classificação foram desenvolvidos em coortes de doentes com artrite precoce e exigem pelo menos uma única articulação clinicamente tumefacta, na ausência de outras doenças que expliquem o sintoma. Além disso, permitem uma avaliação mais sensível da extensão do envolvimento articular. Em alternativa a articulações dolorosas e clinicamente tumefactas, as articulações podem ser consideradas envolvidas, para efeito de contagem articular, se se apresentarem "ativas" na ecografia ou na ressonância magnética (RM). Os novos critérios incluem os marcadores serológicos (FR e ACPAs), uma longa duração dos sintomas e os marcadores laboratoriais de inflamação sistémica. Os critérios foram validados em múltiplos contextos, apresentando um ganho de sensibilidade de cerca de 21% face aos critérios anteriores, e uma perda de 16% em termos de especificidade (49).

1.4. Avaliação da doença e objetivos terapêuticos

O seguimento clínico dos doentes inclui sempre uma avaliação de pelo menos três domínios da doença: a atividade inflamatória, o dano estrutural articular e a capacidade funcional.

A avaliação da atividade da doença é crucial no seguimento dos doentes com artrite reumatoide, sendo recomendada a utilização, na prática clínica diária, de medidas compostas de atividade de doença, que incluem a contagem articular (50, 51). O *Disease Activity Score using 28 joint count* (DAS28) é o índice de atividade da doença mais utilizado e inclui, numa fórmula matemática complexa, a contagem de 28 articulações (número de dolorosas e de tumefactas), um parâmetro de fase aguda [VS ou PCR (DAS28-VS ou DAS28-PCR)] e a escala visual analógica (em mm) da atividade global da doença percecionada pelo doente (52). O DAS28, o *Simplified Disease Activity Index* (SDAI) (53) e o *Clinical Disease Activity Index* (CDAI) (54) são variáveis

numéricas contínuas, que refletem a atividade da doença (quanto maior, pior) e permitem, a cada momento, classificar o grau de atividade da doença (elevada, moderada, baixa e remissão) (52, 55). Por outro lado, existe uma relação quase linear entre estes índices de atividade de doença, o comprometimento da função física pela doença (51, 54, 56) e a progressão do dano estrutural articular (57, 58). As metas terapêuticas na artrite reumatoide são a remissão (na artrite reumatoide precoce) ou a manutenção de baixa atividade de doença (na doença de longa duração) (59, 60). O ACR e a *European League Against Rheumatism* (EULAR) desenvolveram novos critérios de remissão, com base na definição Booleana de remissão ou utilizando os critérios SDAI ($<3,3$) ou CDAI ($<2,8$) (61). Outras definições de remissão (a remissão de acordo com os critérios DAS28-VS, por exemplo) parecem não corresponder a uma verdadeira remissão, uma vez que estão associadas à progressão do dano estrutural articular (62), à presença de comorbilidades (63) e a uma atividade de doença residual num número significativo de doentes (64, 65). Estes factos verificam-se mesmo para valores de DAS28 inferiores a 2,6 (61, 66). Esta questão é ainda controversa, mas a classificação da remissão de acordo com os critérios DAS28-VS ou DAS28-PCR (67, 68) parece resultar numa frequência elevada de falsos-positivos em termos de resposta clínica, particularmente quando são utilizados fármacos que afetam a resposta de fase aguda. Por outro lado, podem verificar-se diferenças significativas nos graus de atividade de doença entre o DAS28-VS e o DAS28-PCR (69). Em suma, os novos critérios de remissão parecem estar intimamente relacionados com a ausência de atividade inflamatória residual (70), enquanto que as outras definições de remissão correspondem mais a um estado de baixa atividade da doença (70).

Finalmente, também é importante avaliar a progressão dos danos estruturais articulares da doença. O tratamento da artrite reumatoide visa prevenir ou mesmo interromper os danos estruturais, minimizando ou revertendo a incapacidade funcional. Na prática clínica, as radiografias são geralmente efetuadas anualmente e avaliadas semi-quantitativamente. A utilização de um *score* radiográfico que permite quantificar a progressão das erosões e do estreitamento da interlinha articular, como nos ensaios clínicos, tem-se revelado uma metodologia precisa e sensível (71). No entanto, outras modalidades de imagem médica estão a ser cada vez mais utilizadas, especialmente para fins de diagnóstico. A RM permite detetar áreas de edema medular ósseo, que correspondem a erosões potenciais (iniciais ou futuras) (72). Por outro lado, a presença de erosões correlaciona-se bem com a tumefação articular avaliada clinicamente. A ecografia permite quantificar o grau e a extensão da inflamação sinovial através de duas medições distintas, a da escala de cinzentos e a do sinal de *Power-Doppler* (66, 73, 74). Para o seguimento dos doentes, a remissão ecográfica não parece oferecer benefício adicional para além dos critérios de remissão/baixa atividade da doença aferidos clinicamente

(75). Na realidade, a sua utilização parece associar-se a *overtreatment*, uma vez que muitos indivíduos saudáveis podem apresentar sinais compatíveis com sinovite e aumento da vascularização da sinovial na ecografia e também na RM (76).

A função física é habitualmente avaliada com recurso ao *Health Assessment Questionnaire Disability Index* (HAQ) (77), sendo este geralmente preenchido pelo doente em todas as visitas clínicas.

1.5. Estratégia terapêutica

A inflamação está no cerne das manifestações clínicas (sintomas clínicos, dano articular, incapacidade e comorbilidades) da artrite reumatoide (40), pelo que a sua supressão é o principal objetivo terapêutico. Se a inflamação diminuir rapidamente, o dano ou a sua progressão são evitados, a função física melhora e eventualmente o doente fica sem sequelas. Assim, o tratamento da artrite reumatoide requer uma abordagem estratégica, em que a avaliação regular da atividade da doença com recurso a índices compostos é que condiciona os ajustes terapêuticos (estratégia *treat to target*) (70). A escalada terapêutica deve ser sempre equilibrada em função dos fatores de risco individuais do próprio doente e os relativos ao tratamento em causa (70).

Na artrite reumatoide, o diagnóstico precoce e o início célere do tratamento com DMARDs são fundamentais para evitar os danos estruturais e as respetivas consequências clínicas (78). Quanto menor for a atividade de doença alcançada após os primeiros 6 meses de tratamento, melhor será o resultado a longo prazo. Ao atingir-se a remissão clínica ao fim de 3-6 meses de terapêutica é possível interromper a progressão do dano, independentemente do regime terapêutico utilizado (57, 62). Assim, medidas tais como o estabelecimento da baixa atividade da doença ou a remissão como alvos terapêuticos, a utilização regular de medidas compostas de aferição da atividade de doença (especialmente as que incluem contagem articular sistemática) e o ajuste rápido (em poucos meses) de terapêutica com DMARDs se o alvo terapêutico não tiver sido alcançado, conduzem aos melhores resultados em termos de saúde (79, 80). A associação de corticosteroides em baixa dose maximiza os benefícios clínicos, funcionais e estruturais dos *conventional synthetic* DMARDs (csDMARDs) (81). Na presença de fatores de mau prognóstico, a utilização do metotrexato como primeiro csDMARD e a associação de um agente biotecnológico (nomeadamente, naqueles doentes que não atingem o grau de baixa atividade da doença em 6 meses de tratamento com o metotrexato e que têm um elevado risco de progressão radiográfica) permite otimizar os resultados terapêuticos (82).

1.6. Morbidade cardiovascular

1.6.1. Epidemiologia

A artrite reumatoide aumenta o risco de enfarte do miocárdio e de acidente vascular cerebral de forma independente dos fatores de risco clássicos para a aterosclerose (83). A artrite reumatoide confere um risco cardiovascular de magnitude semelhante ao da diabetes *mellitus* tipo 2 (84). Os doentes com artrite reumatoide têm *standard mortality rates* triplas face à população geral e as doenças cardiovasculares são a sua primeira causa de morte, ou seja, cerca de 1/3 de todas as mortes (85). Para além disso, verifica-se um aumento do risco da doença arterial periférica nos doentes com artrite reumatoide (86). Dados recentes da literatura confirmam que a mortalidade aos 30 dias e a 1 ano, assim como as taxas de revascularização, após enfarte agudo do miocárdio, estão aumentadas em todos os tipos de artrite e conectivites (87). Dados do registo de Norfolk sugerem que apesar dos avanços na terapêutica dos doentes com artrite reumatoide, com início de tratamento mais precoce e com recurso aos agentes biotecnológicos, as mortalidades global e de causa cardiovascular não diminuíram nos últimos 7 anos (88). Por outro lado, o estudo prospetivo ACT-CVD, que segue uma coorte de 480 doentes holandeses com artrite reumatoide, reporta uma redução dramática na mortalidade cardiovascular, que passou de 58% em 1998 para 6,9% atualmente (89). De qualquer forma, o desenvolvimento de estratégias de rastreio cardiovascular precoce, recorrendo a *scores* de risco cardiovascular bem estabelecidos e/ou a técnicas de imagem não-invasivas ou a doseamentos de biomarcadores que permitam a deteção de doença vascular pré-clínica, é imperioso, de forma a prevenir a morbimortalidade cardiovascular em doentes com artrite reumatoide (85, 90).

1.6.2. Fatores de risco cardiovascular tradicionais

Na artrite reumatoide, o aumento do risco cardiovascular poderá resultar da ativação imunológica e da inflamação sistémicas. Além disso, a persistência de níveis séricos elevados de diversos reagentes de fase aguda, como a PCR e as citocinas pró-inflamatórias, como o TNF α e a IL6, está associada à presença de aterosclerose e à ocorrência de eventos cardiovasculares (91). Nos doentes com artrite reumatoide, o risco cardiovascular correlaciona-se com a duração e gravidade da atividade da doença inflamatória, sendo ainda potenciado pela incapacidade funcional (sedentarismo) e pela utilização crónica de corticosteroides (92). Uma meta-análise recente de 10 estudos, em populações de doentes reumatoides, mostrou que a prevalência dos fatores de risco cardiovascular tradicionais não é desprezível. O risco cardiovascular associou-se significativamente à hipertensão arterial [risco relativo (RR) 1,84], à diabetes *mellitus* tipo 2 (RR 1,89), ao tabagismo (RR 1,50), à obesidade (RR 1,16) e à hipercolesterolemia (RR 1,73), mas não

com o sedentarismo (93). Noutra meta-análise, também em doentes com artrite reumatoide, verificou-se um aumento do risco da síndrome metabólica (RR 1,24), com prevalências de 39 a 42% na doença de longa evolução *versus* 16 a 31% na doença precoce (94, 95).

Na artrite reumatoide pode verificar-se hiperinsulinemia e aumento da resistência à insulina, sobretudo devido às citocinas pro-inflamatórias, como o TNF α , e às adipocinas (95, 96). Em doentes reumatoides, a resistência à insulina está associada à PCR, aos níveis de IL6 e de TNF α , ao conteúdo coronário em cálcio e à formação de placas de aterosclerose nas carótidas (97, 98). Além disso, numa coorte de doentes com artrite reumatoide, gota e osteoartrose, constatou-se que os níveis séricos de urato se correlacionavam com um aumento do índice de massa corporal (IMC) e da incidência de enfarte do miocárdio nas 3 doenças (99).

Apesar da obesidade ser frequente nos doentes com artrite reumatoide, a caquexia é que tem sido associada a uma maior atividade de doença e a um aumento da mortalidade cardiovascular (100). A obesidade tem sido relacionada com uma diminuição da mortalidade cardiovascular (59). Os doentes com IMC<20 têm menor probabilidade de sobreviver a eventos cardiovasculares do que aqueles com IMC>30 (101). Os doentes obesos têm 1,6 vezes maior risco de desenvolver uma artrite reumatoide ACPAs-negativa quando comparados com os de peso normal (102). A artrite reumatoide é ainda caracterizada por uma alteração na composição corporal, com um aumento relativo da massa gorda e diminuição da massa magra (músculo), sem ou com mínima alteração do IMC (95, 100). A adiposidade abdominal é característica da artrite reumatoide (101, 103). Na população reumatoide, o aumento da massa gorda visceral tem sido associado a um aumento da glicemia em jejum, à hipertensão arterial e à síndrome metabólica (101, 103). A massa gorda visceral tem sido associada à seropositividade para o FR e a valores elevados de PCR (101, 104).

1.6.3. O paradoxo lipídico

Em doentes com artrite reumatoide ou com outras formas de inflamação, foram descritas alterações peculiares no perfil lipídico (105). A artrite reumatoide ativa, com elevado grau de inflamação e com PCR elevada, está associada a concentrações séricas baixas do colesterol total e do colesterol LDL. Pelo contrário, quando ocorre resolução da inflamação (com a normalização da PCR), observa-se uma elevação do colesterol total e do colesterol LDL (95, 106). Estudos na pré-artrite reumatoide e na artrite reumatoide precoce demonstraram a presença dum perfil lipídico compatível com o observado na síndrome metabólica, com valores normais ou ligeiramente elevados do colesterol total, do colesterol LDL e dos triglicerídeos associados a um decréscimo nos níveis do colesterol HDL (95, 106). A progressão para artrite reumatoide estabelecida é caracterizada por uma inflamação elevada, recorrente ou persistente, que

conduz a uma diminuição da massa muscular e da gordura branca do tecido celular subcutâneo, com consequente aumento da gordura visceral (96, 103). Esta obesidade visceral relacionada com a inflamação e o catabolismo aumentado mantem o IMC, mas conduz a uma diminuição gradual dos níveis do colesterol total, do colesterol LDL, dos triglicerídeos e do colesterol HDL. Contudo, anos antes do diagnóstico de artrite reumatoide, pode verificar-se uma diminuição relativa no colesterol total e no colesterol LDL, com uma melhoria na razão colesterol total/colesterol HDL (106).

Além das alterações quantitativas do perfil lipídico, na artrite reumatoide, verifica-se a presença de alterações na composição das partículas lipoproteicas. As partículas LDL apresentam alterações fenotípicas, sendo mais pequenas e mais densas, penetrando mais facilmente na subíntima das artérias (107, 108). Por outro lado, verifica-se também um aumento da permeabilidade vascular, que favorece ainda mais a entrada das LDL que poderão ser oxidadas na subíntima (109). Estas LDL oxidadas ativam as células endoteliais, aumentam a expressão das moléculas de adesão celular e induzem a secreção de quimiocinas que levam a uma perpetuação da entrada de leucócitos no espaço sub-endotelial (e sua ativação) contribuindo para o desenvolvimento de placas ateroscleróticas (110). Na artrite reumatoide, também se verifica um aumento nas LDL oxidadas circulantes, relacionado com a atividade da doença (110, 111). Paralelamente, observa-se a presença de HDLs disfuncionais pro-inflamatórias, com compromisso da capacidade de efluxo do colesterol (112). Nos doentes com artrite reumatoide ativa, na composição das HDL, constata-se um aumento crescente de proteínas de fase aguda, nomeadamente de proteína amiloide A sérica e da fosfolipase A2, e uma redução nos constituintes anti-aterogénicos, como a paraoxonase, enzima com características antioxidantes, comprometendo assim a *clearance* dos fosfolipídeos oxidados (98). Por outro lado, a inibição da via de sinalização do recetor da IL6 pelo tocilizumab e pelos inibidores das *Janus kinases* (JAKs) (tofacitinib e baricitinib) provoca um aumento pronunciado nas concentrações séricas de lipídeos em doentes com artrite reumatoide (105). Este facto parece refletir uma melhoria na atividade da doença, levando a uma "normalização" paradoxal dos níveis séricos do colesterol total, do colesterol HDL e do colesterol LDL com a redução da inflamação ou, por outro lado, pode ser uma consequência de efeitos específicos e diretos das citocinas nas vias metabólicas (113). Curiosamente, as alterações na composição das partículas lipídicas relacionadas com a doença revertem após a inibição da via de sinalização da IL6 (114) e, aparentemente, o aumento do colesterol é maior com a inibição desta via do que com a inibição da via de sinalização do TNF α (115). Foram ainda descritos efeitos diretos do tofacitinib sobre o metabolismo dos ésteres de colesterol, pelo que se pode especular acerca da existência de efeitos dos inibidores das JAKs que serão independentes da supressão da atividade inflamatória (116). O controlo da

inflamação sistêmica reduz o risco cardiovascular em doentes com artrite reumatoide (113). O metotrexato reduz o risco cardiovascular de forma moderada (117) e grandes registros epidemiológicos revelaram um efeito protetor dos inibidores do TNF α em termos de eventos cardiovasculares (118, 119). Os resultados do estudo MEASURE (114), com o tocilizumab, associaram definitivamente a inibição da via de sinalização da IL6 a mudanças favoráveis na constituição das partículas lipídicas, que se sobrepõem às suas alterações quantitativas. Por outro lado, num estudo de comparação direta entre o tocilizumab e o etanercept em doentes com artrite reumatoide verificou-se não existir diferença na incidência de eventos cardiovasculares, apesar da magnitude da diferença na variação das concentrações das diferentes frações lipídicas, mediada pela inibição seletiva de duas citocinas distintas, a IL6 e o TNF α , respetivamente (113). O impacto no risco cardiovascular das alterações no metabolismo lipídico, já observadas, pela inibição da via de sinalização das JAKs 1 e 3 com o tofacitinib, na artrite reumatoide, ainda não é conhecido (116).

1.6.4. Fatores de risco cardiovascular não-tradicionais

Nos doentes com artrite reumatoide, para além dos fatores de risco tradicionais, existe uma plêiade infindável de outros fatores de risco associados à inflamação e à auto-imunidade. Assim e relativamente às proteínas de fase aguda, o aumento dos níveis séricos de PCR têm sido implicados na aterosclerose acelerada, que se verifica nos doentes com artrite reumatoide (120). A PCR prediz a morbilidade e mortalidade cardiovasculares, inclusivamente em indivíduos saudáveis (121). Além disso, a VS também está associada ao aumento do risco cardiovascular e é também um preditor de mortalidade cardiovascular na artrite reumatoide (122). Por outro lado, os auto-anticorpos na artrite reumatoide estão envolvidos na aterosclerose acelerada, tendo as células endoteliais como o seu principal alvo (110). O FR aumenta o risco de desenvolver aterosclerose na artrite reumatoide (110), tendo já sido descritos níveis mais elevados de FR em doentes reumatóides com disfunção endotelial e aterosclerose carotídea (123). Recentemente, a positividade para o FR foi associada a um aumento de mortalidade global na artrite reumatoide [*hazard ratio* (HR): 1,47] (124). De igual forma, a seropositividade para os ACPAs foi também associada a um aumento do risco de mortalidade cardiovascular na artrite reumatoide (HR: 1,52) (124). Numa coorte de 10000 indivíduos, a coorte WHI, a seropositividade para os ACPAs mostrou conferir um risco aumentado de doença cardiovascular fatal e não-fatal, acidente cerebrovascular e mortalidade cardiovascular, comparativamente à seronegatividade (125). Por outro lado, os anticorpos anti-LDL oxidadas são detetados em cerca de 10% dos doentes com artrite reumatoide (120). Estes últimos têm sido associados à destabilização da placa aterosclerótica no contexto das síndromes coronárias agudas (126). Os

anticorpos anti-fosfolipídicos são detetados em cerca de 20% dos doentes com artrite reumatoide e o seu papel na aterosclerose associada a esta doença está ainda por confirmar (120). Entre os fatores genéticos, o epítipo partilhado HLA-DRB1 tem sido associado à doença cardiovascular dependente da inflamação (127). A presença de duas cópias de alelos com o epítipo partilhado prediz morte de causa cardiovascular (HR: 1,68), sendo a combinação *human leukocyte antigen class II beta chain 1* (HLA-DRB1) *01/*04 aquela que lhe é mais fortemente associada. Também se verificou para a interação epítipo partilhado - tabagismo - positividade para os ACPAs uma forte associação a um risco aumentado de morte de causa cardiovascular (HR: 7,81) (128). Adicionalmente, as células T têm sido implicadas na artrite reumatoide e na aterosclerose (127, 129). Nestas patologias, verifica-se um desequilíbrio na razão celular Th17/T reguladoras (Treg) (a favor do numerador), que conduz à perpetuação da inflamação na sinovial e na parede arterial, respetivamente (120). Na artrite reumatoide, as células T CD4+ CD28-, um subtipo especial de células T, têm sido implicadas na disfunção endotelial e no desenvolvimento de aterosclerose carotídea (120). As moléculas de adesão celular, nomeadamente a *intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1, ICAM-3, *vascular cell adhesion molecule* (VCAM)-1, P- e E-selectinas estão também associadas à aterosclerose no contexto da artrite reumatoide (130). Entre as citocinas pro-inflamatórias, o TNF α e a IL6 desempenham um papel crucial na inflamação vascular subjacente à aterosclerose acelerada, relacionada com a artrite reumatoide. A sua produção aumentada tem sido associada à incidência de insuficiência cardíaca, resistência à insulina, dislipidemia e obesidade. Ambas as citocinas são preditores de morbilidade futura associada a doenças cardiovasculares e da mortalidade de causa vascular (131). Os níveis plasmáticos de IL6 parecem correlacionar-se com a disfunção endotelial e com a aterosclerose carotídea em doentes com artrite reumatoide (123). A IL1 e IL18 parecem também ter algum papel neste contexto, ainda não totalmente esclarecido (120). Dentro das quimiocinas, na artrite reumatoide encontrou-se um aumento da produção de *C-C motif chemokine ligand 2* (CCL2)/*monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1) (120) e sabe-se que os níveis séricos de CCL2/MCP-1 estão associados à incidência de doença cardiovascular (mesmo na população geral) (132). Em termos de metaloproteínases da matriz, a *matrix metalloproteinase 9* (MMP-9) é considerada o fator mais importante na formação das placas ateroscleróticas na artrite reumatoide (120).

O tecido adiposo produz um número considerável de adipocinas que, quer na artrite reumatoide, quer na doença cardiovascular, atuam numa rede complexa. Nesta rede, destacam-se a resistina, a adiponectina, a leptina, a visfatina e a chemerina (133). Na artrite reumatoide, níveis séricos elevados de resistina foram associados à inflamação e à destruição articulares. A resistina, neste contexto, é também um biomarcador de resistência à insulina, aterosclerose e

doença cardiovascular (134). Por outro lado, se a adiponectina, na síndrome metabólica, é claramente anti-inflamatória e anti-aterogénica, na artrite reumatoide ela é pro-inflamatória (133). No que diz respeito à doença cardiovascular associada à artrite reumatoide, as concentrações de adiponectina estão inversamente associadas à hipertensão arterial e à ativação do endotélio (135), embora fracamente associados à aterosclerose carotídea (136). A leptina é uma adipocina pró-inflamatória, que regula o peso corporal; e níveis elevados de leptina têm sido associados ao aparecimento de doença cardiovascular (137) e de obesidade (95) no contexto da doença reumatoide. Os níveis de visfatina têm sido associados à quantidade de gordura visceral e à inflamação; na artrite reumatoide, os níveis de visfatina circulante correlacionam-se com a atividade da doença e com o aumento do dano articular (133, 138). Finalmente, estudos recentes mostraram que a chemerina estimula múltiplos processos pro-inflamatórios na artrite reumatoide (139), tendo sido recentemente associada à espessura da íntima-média da carótida comum e no desenvolvimento de placas ateroscleróticas carotídeas (139). Note-se que esta se associa ao IMC e tem expressão aumentada na diabetes *mellitus* tipo 2 (133).

Finalmente, o sistema RANKL/RANK/osteoprotegerina (OPG) tem sido implicado na calcificação e na rotura das placas de aterosclerose, condições estas consideravelmente prevalentes nos doentes com artrite reumatoide estabelecida (120). O RANKL solúvel induz instabilidade nas placas de aterosclerose dos seres humanos através da indução da produção de quimiocinas como a CCL2/MCP-1 e de metaloproteínases (140). Os níveis de OPG têm sido associados e de forma independente à aterosclerose coronária (141).

1.7. Avaliação do risco cardiovascular

1.7.1. Scores clínicos de risco cardiovascular

Para avaliar o risco cardiovascular na população geral podemos recorrer a diferentes instrumentos, nomeadamente: o *systematic coronary risk evaluation* (SCORE), o *Framingham risk score* (FRS), o *Reynolds risk score* (RRS) ou o *QRISK2 cardiovascular disease risk score* (QRISK2) (120). Todos estes instrumentos incluem a idade, o sexo, os hábitos tabágicos, a pressão arterial, os lipídeos e outros fatores de risco. O QRISK2 também inclui a artrite reumatoide. Todos estes instrumentos determinam o risco de eventos cardiovasculares a 10 anos (85). A EULAR recomenda que o valor obtido para o *score* de risco seja multiplicado por 1,5 se o doente com artrite reumatoide cumprir 2 dos 3 critérios seguintes: duração de doença superior a 10 anos; positividade para o FR ou ACPAs ou presença de manifestações extra-articulares (o chamado SCORE modificado) (85). No caso do QRISK2, como a artrite reumatoide já está incluída não é necessário este fator de correção. (120). Um estudo recente, em doentes

com artrite reumatoide, comparou estes 4 instrumentos entre si e concluiu que o SCORE, o FRS e o RRS subestimam enquanto que o QRISK2 sobrestima o risco cardiovascular na população reumatoide (92). Contudo, é possível que surjam modificações destes instrumentos padronizados. Um estudo americano recente, adicionou à versão padronizada do FRS vários parâmetros da doença reumatoide (duração da doença, atividade da doença avaliada pelo CDAI, HAQ modificado e uso de corticosteroides), melhorando a força da predição do risco cardiovascular (142). Pelo contrário, um trabalho europeu, também recente, ao adicionar parâmetros extra ao SCORE original não melhorou o valor da predição do risco cardiovascular (142). Assim, a EULAR recomenda a utilização do SCORE tradicional, que considera ser suficiente (142).

1.7.2. Imagiologia cardiovascular não-invasiva

A artrite reumatoide tem sido associada à presença de aterosclerose acelerada e generalizada, que é precedida de uma disfunção endotelial e de uma rigidez arterial. Na realidade, todos estes três processos podem ser detetados através de técnicas imagiológicas não-invasivas, apoiadas em ecografia (143).

A vasodilatação mediada pelo fluxo (*flow-mediated vasodilation*, FMD) da artéria braquial, determinada por ecografia modo-B, é um marcador da vasodilatação dependente do endotélio (143). A presença de disfunção endotelial precoce, verificada por esta técnica, tem sido descrita mesmo em doentes jovens com artrite reumatoide precoce com atividade moderada da doença (131, 144, 145). Essa disfunção endotelial, sustentada no tempo, conduz a uma deterioração das artérias, indiciada pela espessura íntima-média das carótidas comuns (*common carotid intima-media thickness*, cclMT) e pela velocidade da onda de pulso (123).

A cclMT e a deteção de placas são bons indicadores de aterosclerose generalizada (143). Vários autores constataram um aumento significativo da cclMT nos doentes com artrite reumatoide com maior duração de doença (120). Estes achados refletem assim a presença de aterosclerose subclínica em doentes sem história de doença vascular prévia (123). A aterosclerose carotídea tem sido associada ao tabaco e à positividade para os ACPAs (123). Na artrite reumatoide para além do aumento da cclMT, também se verifica um aumento da prevalência de placas ateroscleróticas carotídeas (146). A avaliação destes dois parâmetros é útil na estratificação de risco cardiovascular, já que a cclMT e a presença de placas se têm associado aos diferentes graus de risco cardiovascular (baixo, moderado, alto e muito alto), determinados pelo SCORE (147). Num estudo recente, a ecografia carotídea mostrou-se mais sensível do que o SCC por tomografia computadorizada (TC) na estratificação do risco cardiovascular em doentes com artrite reumatoide (148). Também em doentes com artrite reumatoide, a presença de placas carotídeas

está associada a uma diminuição da sobrevida livre de doença cardiovascular e está fortemente ligada à ocorrência futura de síndrome coronária aguda, com uma taxa de síndrome coronária aguda de 1,1 [intervalo de confiança (IC) 95%: 0,6-1,7] por 100 pessoas-ano para doentes reumatoides sem placas carotídeas e de 4,3 (IC 95%: 2,9- 6,3) por 100 pessoas-ano para aqueles com placas bilaterais (149, 150). Neste contexto, para além dos fatores de risco cardiovasculares tradicionais, fatores específicos da artrite reumatoide contribuem para a presença de aterosclerose carotídea (151). A duração da doença e a atividade da doença demonstraram estar associadas ao tamanho e à vulnerabilidade da placa de ateroma em doentes com artrite reumatoide (152). Por outro lado, as mais recentes diretrizes da *European Society of Cardiology* (ESC) sobre prevenção de doença cardiovascular na prática clínica recomendam o rastreio da aterosclerose das artérias carótidas em doentes com risco moderado de doença cardiovascular (classe: IIa, nível de evidência: B, grau: forte) (153). Também, as novas recomendações EULAR para manejo do risco de doença cardiovascular na artrite reumatoide preconizam que o rastreio ecográfico da presença de placas ateroscleróticas carotídeas assintomáticas possa ser considerado como fazendo parte da avaliação de risco de doença cardiovascular em doentes com artrite reumatoide (90).

Por outro lado, a rigidez arterial reflete-se na velocidade da onda de pulso (*pulse-wave velocity*, PWV) (143). Um estudo realizado numa coorte de 101 doentes auto-imunes, onde se incluíram doentes com artrite reumatoide, revelou a presença de um aumento significativo na PWV neste tipo de população (143). A rigidez arterial correlaciona-se com a disfunção endotelial e com a aterosclerose carotídea (154).

Num estudo que combinou várias destas técnicas de imagem, detetou-se um compromisso da FMD e um aumento significativo da cIMT em doentes com artrite reumatoide, comparativamente a controlos saudáveis. O aumento da cIMT associou-se a níveis séricos elevados de TNF α e IL1. Além disso, tanto o compromisso da FMD como o aumento da cIMT se associaram à seropositividade para o FR e os ACPAs (123).

A angiografia coronária (angio-TC), que permite diferenciar entre placas estáveis e instáveis, pode ter interesse em doentes com artrite reumatoide uma vez que estes apresentam mais placas instáveis *versus* estáveis, quando comparados com controlos (155).

Outras técnicas não invasivas, como o SCC, o índice tornozelo-braço e os testes de isquemia, também têm lugar nesta estratificação de risco cardiovascular.

Por outro lado, numerosos biomarcadores têm sido avaliados com o objetivo de determinar o risco cardiovascular. Presentemente, é necessário definir o(s) método(s) com melhor valor preditivo em termos de *outcomes* cardiovasculares. Num estudo recente, verificou-se que a razão apolipoproteína B (ApoB)/ApoA1 é o melhor preditor de progressão da doença

cardiovascular (HR: 4,5) quando comparado com outros, como os lipídeos, a VS e a PCR (HR: 1,1-2,2) (156). O *N-terminal pro b-type natriuretic peptide* (NT-proBNP) é também um bom marcador de mortalidade global e mortalidade cardiovascular na artrite reumatoide (157). Os níveis séricos de NT-proBNP e da troponina cardíaca de alta sensibilidade estão também aumentados na artrite reumatoide e são fatores de risco cardiovascular. Além disso, ambos se relacionam com a atividade da doença e a PCR (154). Num futuro próximo, prevê-se o desenvolvimento dum *score* de múltiplos biomarcadores que combine os fatores com maior valor preditivo (120).

1.8. Dano osteo-articular

O envolvimento ósseo na artrite reumatoide constitui uma das suas principais complicações extra-articulares, radiograficamente identificáveis, com três vertentes distintas de remodelação óssea alterada: destruição óssea local (ou erosão óssea, geralmente de localização marginal na articulação, na área onde o osso contacta diretamente com a sinovial inflamada), perda óssea peri-articular localizada (resultante dos efeitos de diversas citocinas e outros fatores no osso vizinho à articulação inflamada) e perda óssea generalizada do esqueleto (quer do esqueleto axial, quer do apendicular; pela ação de diversas citocinas e outros fatores, que entram na circulação sanguínea até locais distantes da sinovite) (158, 159). As erosões ósseas raramente sofrem reparação, mesmo quando se verifica um bom controlo clínico da inflamação (160) e são o resultado dum aumento da reabsorção óssea pelos osteoclastos na periferia das áreas inflamadas nas articulações, associado a uma supressão da formação óssea (158). As erosões ósseas na artrite reumatoide são preditores da destruição óssea/articular e da perda óssea generalizada futuras (161). A fragilidade óssea pode surgir como um resultado da sinovite ativa mas, em doentes com ACPAs, ela pode já estar presente antes da doença clínica e, portanto, antes da presença dos sinais clínicos de sinovite (162). A perda óssea peri-articular ocorre então numa fase pré-clínica e antes que possam ser identificadas as erosões ósseas típicas da artrite reumatoide nas radiografias convencionais de mãos e pés. A perda óssea peri-articular é um preditor da destruição óssea/articular local e da perda óssea generalizada futuras (163). A perda óssea generalizada também já está presente no início do processo da doença reumatoide e relaciona-se com fatores de risco gerais (como a idade, o sexo e o IMC) e fatores específicos da artrite reumatoide, onde se incluem a inflamação sistémica, a atividade e duração da doença, a imobilidade e os efeitos no osso das diversas terapêuticas utilizadas no controlo da doença (158). Na artrite reumatoide verifica-se um aumento do risco de fratura das vértebras e da anca, assim como de fraturas não-vertebrais não-anca (164). O risco de fratura é duplo quando comparado com o de indivíduos saudáveis com a mesma idade, constituindo uma importante

fonte de comorbilidade na artrite reumatoide. O risco de fraturas vertebrais pode já estar aumentado no início do processo da doença (158). A etiologia do risco aumentado de fratura nos doentes com artrite reumatoide é multifatorial e inclui os fatores de risco gerais [fatores de risco clínico como a idade, estado de pós-menopausa, densidade mineral óssea (DMO)] e os fatores de risco específicos da doença (atividade inflamatória da doença e suas implicações na remodelagem óssea, positividade para os ACPAs e para o FR, duração da doença, incapacidade funcional, sarcopenia, caquexia reumatoide, risco de queda por destruição marcada das articulações dos membros inferiores, uso de csDMARDs e/ou agentes biotecnológicos, dose e duração da terapêutica com corticosteroides) (165, 166). A morbilidade associada às fraturas pode ser ainda muito mais incapacitante se estas ocorrerem em doentes reumatoides com doença ativa e/ou com restrições funcionais prévias. Além disso, os doentes com artrite reumatoide com uma fratura recente apresentam como consequência um aumento na atividade da doença e têm um aumento da probabilidade de morte prematura após fratura da anca. Assim, e dado o aumento do risco de fratura, os doentes com artrite reumatoide com idade superior a 50 anos, os doentes mais jovens com doença ativa persistente e os doentes reumatoides sob terapêutica com corticosteroides devem ser estratificados em termos de risco de fratura (158).

A avaliação do risco de fratura na artrite reumatoide engloba a avaliação dos fatores de risco clínicos, já referidos: idade avançada, sexo feminino, baixo peso corporal, história pessoal e familiar de fraturas, risco de queda e padrões de estilo de vida (tabagismo, etilismo). Estes fatores estão também incluídos nos algoritmos de risco de fratura como o *fracture risk assessment tool* (FRAX), desconhecendo-se, no entanto, quais as suas implicações nas decisões terapêuticas no contexto da artrite reumatoide (158). O FRAX foi já validado em muitos países, incluindo Portugal, mas demonstrou sobrestimar o risco de fratura na artrite reumatoide (167). A absorciometria por duplo feixe de raios-X (DXA) é o método de eleição para avaliar a DMO vertebral e femoral. As radiografias da coluna vertebral são fundamentais, dada a elevada prevalência de fraturas vertebrais assintomáticas nos doentes com artrite reumatoide, explicadas pelo consumo frequente de analgésicos e anti-inflamatórios (esteroides e não-esteroides). No entanto, a presença, o número e a gravidade das fraturas vertebrais estão associadas a risco aumentado de nova(s) fratura(s) (164). Uma fratura vertebral não-traumática prevalente é, portanto, uma indicação por si só para uma estratégia terapêutica de prevenção da fratura, independente da DMO (158).

Um doente com artrite reumatoide, após ter sido identificado como tendo um alto risco de fratura, deve ser aconselhado em termos de estilo de vida saudável (parar de fumar e limitar a ingestão de bebidas alcoólicas), de prevenção de queda, duma ingestão diária de cálcio

adequada (1000-1200 mg/dia no total) e da necessidade de suplementação em vitamina D (800 UI/dia) (158). A prescrição de terapêutica imunossupressora, no sentido de reduzir a perda óssea induzida pela inflamação, e a redução da corticoterapia, para a dose e a duração de tratamento minimamente necessárias, constituem também medidas essenciais na prevenção de fraturas no doente reumatoide. Nos doentes reumatoides sob corticoterapia devem seguir-se as normas de orientação para a prevenção da osteoporose induzida por corticosteroides (168). Na artrite reumatoide não existem ensaios clínicos randomizados e controlados (RCTs) em que a redução do risco de fratura seja um *endpoint* primário. Já em doentes com corticosteroides, onde se incluem os doentes com artrite reumatoide, os RCTs demonstraram que os bisfosfonatos (alendronato, risedronato e zoledronato) aumentam a DMO, mas mais uma vez não existe nenhum estudo que tenha incluído a prevenção de fraturas como *endpoint* primário (158). Num RCT em doentes sob corticosteroides, também não exclusivamente reumatoides, verificou-se que a teriparatida, um fármaco osteo-anabólico, diminuiu significativamente o risco de fraturas vertebrais em comparação direta com o alendronato (169), o que está de acordo com a diminuição vincada da formação óssea tão característica dos corticosteroides. Adicionalmente, os bisfosfonatos (alendronato, risedronato e zoledronato) e o denosumab demonstraram reduzir o risco de fraturas vertebrais, não-vertebrais e da anca em mulheres pós-menopáusicas com osteoporose; embora este resultado não tenha sido obtido em doentes selecionados com base no diagnóstico de artrite reumatoide. O denosumab e o zoledronato também demonstraram inibir a progressão das erosões ósseas em doentes reumatoides tratados com metotrexato. Além disso, a utilização de agentes biotecnológicos está associada a uma diminuição da atividade osteoclástica e a um aumento dos biomarcadores de formação óssea, resultando em efeitos positivos na DMO na coluna vertebral e na anca na maioria, mas não em todos, os estudos (158). Contudo, até à data, nenhum estudou conseguiu mostrar que os csDMARDs ou os agentes biotecnológicos são suficientes para a prevenção das fraturas no contexto da artrite reumatoide (170).

1.8.1. Reabsorção óssea

Ao longo da última década, os osteoclastos foram amplamente reconhecidos como o tipo celular responsável pelas erosões ósseas na artrite reumatoide. Inicialmente e para demonstrar de forma definitiva que os osteoclastos estavam presentes em amostras cirúrgicas de osso subcondral de doentes com artrite reumatoide, utilizaram-se vários marcadores para os identificarem, nomeadamente a *tartrate resistant acid phosphatase* (TRAP) (não específico dos osteoclastos), a catepsina K e o recetor da calcitonina (o marcador definitivo dos osteoclastos que reabsorvem o osso) (171). Assim, encontraram-se células grandes e multinucleadas não

apenas no osso subcondral mas também na interface *pannus*-osso e no local da erosão óssea, corroborando a hipótese inicial. O RANKL é também necessário para que esse processo ocorra e a sinovial inflamada, através dos linfócitos e sinoviócitos semelhantes a fibroblastos, fornece-o. O RANKL em sinergia com as citocinas pró-inflamatórias promove a diferenciação dos osteoclastos a partir de precursores mononucleares na sinovial (159).

Posteriormente, foi demonstrado que os osteoclastos são essenciais para que ocorra a erosão óssea. Com este objectivo, utilizou-se o modelo animal K/BxN *serum-transfer* que é um modelo de artrite que resulta da transferência de soro de ratos transgênicos que expressam simultaneamente *T cell receptor (TCR) transgene KRN* e *MHC class II molecule I-A^{g7}* (K/BxN) (172) para ratos nativos. Assim, neste modelo, demonstrou-se que os ratos com deficiência em RANKL, um fator necessário para a diferenciação dos osteoclastos, desenvolviam artrite com destruição da cartilagem mas não erosões ósseas (173). Estes achados foram depois confirmados num estudo em ratos sem c-fos, um fator de transcrição essencial para osteoclastogénese, cruzados com ratos transgênicos que expressavam TNF humano (hTNFtg) (44). Os ratos resultantes deste cruzamento são deficientes em osteoclastos e desenvolvem uma artrite inflamatória dependente do TNF α , muito semelhante à artrite reumatoide. Mais uma vez, apesar da inflamação, as articulações artríticas destes ratos também se mantiveram protegidas da erosão e destruição ósseas. Além disso, bloqueando a interação RANK-RANKL através da OPG, o recetor de chamariz para o RANKL, os ratos hTNFtg ficaram também protegidos contra a perda óssea sistémica (174) e articular. Paralelamente, a inibição da atividade dos osteoclastos em doentes com artrite reumatoide também demonstrou alguma eficácia em termos de inibição da progressão das erosões ósseas. O zoledronato, um bisfosfonato, foi capaz de reduzir o aparecimento de novas erosões articulares, quer em ratos com artrite (175, 176) quer em doentes com artrite reumatoide (177). Além disso, a neutralização do RANKL com o anticorpo monoclonal denosumab também atenuou a progressão das erosões ósseas bem como a perda de DMO da mão e sistémica em doentes com artrite reumatoide (178-180).

Na articulação com artrite reumatoide, a osteoclastogénese é estimulada por vários fatores, nomeadamente as citocinas pró-inflamatórias, os auto-anticorpos e os microARNs. As citocinas, incluindo o TNF α , a IL1 e a IL17, promovem a diferenciação dos precursores dos osteoclastos em osteoclastos (181-183) através de vários mecanismos, incluindo a indução da expressão de RANKL pelos osteoblastos. A IL17 (184), bem como o TNF α em conjunto com a IL6/*soluble interleukin-6 receptor* (sIL6R) (185), induzem a expressão de RANKL pelos sinoviócitos semelhantes a fibroblastos. O TNF α promove também diretamente a diferenciação das células precursoras dos osteoclastos, além de expandir a sua reserva (186). Além disso, a IL1 aumenta diretamente a capacidade dos osteoclastos para reabsorverem o osso (187) e é

também uma mediadora da osteoclastogénese induzida pelo TNF α (181). O papel da IL6 na osteoclastogénese é mais complexo pois, embora induza a expressão de RANKL em sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (185), o seu efeito nos precursores dos osteoclastos é inibitório em vez de estimulante, através da interrupção das vias de sinalização do RANK (188, 189). Contudo, a maioria dos dados *in vivo* indica, no entanto, que o efeito em rede da IL6 é pró-inflamatório e pró-osteoclastogénico (189, 190).

Os ensaios clínicos de intervenção farmacológica ajudaram a validar o impacto das citocinas pró-inflamatórias na osteoclastogénese na artrite reumatoide ao demonstrarem que os agentes biotecnológicos podem retardar ou mesmo parar a progressão radiográfica nesta doença. Neles se incluem os agentes anti-TNF α (191), os antagonistas do IL6R (192) e as pequenas moléculas que bloqueiam a sinalização JAK/*signal transducers and activators of transcription* (STAT) (69, 193).

Adicionalmente, existe uma forte relação entre a presença de "edema medular ósseo" na RM e a subsequente progressão para erosões ósseas nos doentes com artrite reumatoide (72, 194, 195). A análise histológica destas áreas em articulações metacarpo-falângicas revelou que representam a substituição da gordura da medula óssea por infiltrados inflamatórios, constituídos principalmente por células B maduras e células T ativadas (a expressarem RANKL e citocinas pró-inflamatórias que induzem ainda mais a osteoclastogénese) (72). Avaliações histológicas subsequentes destas amostras, revelaram que a densidade de osteoclastos no osso trabecular era maior nas amostras que mostravam osteíte na RM do que naquelas sem osteíte (196).

1.8.2. Osteoclastogénese mediada por anticorpos

Estudos clínicos demonstraram que títulos elevados de ACPAs estão associados à progressão radiográfica em doentes com artrite reumatoide (197, 198) e que os ACPAs e o FR, quando presentes em simultâneo, têm um efeito aditivo no tamanho e número de erosões nos doentes com artrite (199). Além disso, foi demonstrado que os auto-anticorpos promovem a perda óssea, quer por mecanismos mediados pela resposta inflamatória, quer por mecanismos independentes da inflamação (200). Em doentes com artrite reumatoide, as células mononucleares/macrófagos, quando estimuladas por imunocomplexos e ACPAs, produzem grandes quantidades de TNF α contribuindo para a osteoclastogénese (201, 202). Por outro lado, os ACPAs ligam-se à vimentina citrulinada na superfície dos precursores dos osteoclastos induzindo a produção de TNF α o que promove a sua diferenciação em osteoclastos maduros (33). Adicionalmente, a transferência de ACPAs para ratos, induziu a libertação de TNF α dos precursores dos osteoclastos, conduzindo à osteoclastogénese e consequente osteopenia.

Também se demonstrou que os recetores Fc nos precursores de osteoclastos influenciam a osteoclastogénese. Em ratos com artrite demonstrou-se que, em precursores de osteoclastos, a ligação cruzada dos ACPAs ao *intermediate-affinity activating receptor for IgG2a and IgG2b* (CD16.2/mouse homolog of human Fc FcγRIIIA) (FcγRIV) foi capaz de melhorar a diferenciação em osteoclastos; no entanto, a deleção do FcγRIV diminuiu os números de osteoclastos e a destruição óssea (203). O efeito da ligação de resíduos de ácido siálico às porções Fc da IgG na interação dos imunocomplexos com os osteoclastos foi também investigada (204), pois esta adição de ácido siálico é responsável por mediar os efeitos anti-inflamatórios da IgG intravenosa (205). Assim, demonstrou-se que apenas os imunocomplexos sem estes resíduos de ácido siálico é que estimulavam a osteoclastogénese *in vitro* e *in vivo*. Além disso, em ratos com artrite induzida pelo colagénio, verificou-se que a administração de um precursor de ácido siálico resultava em níveis elevados de sialilação da IgG com consequente diminuição das erosões ósseas (204).

Estes achados são ainda corroborados pela surpreendente descoberta de que os indivíduos saudáveis com ACPAs-positivos apresentam sinais de perda de osso em comparação com indivíduos ACPAs-negativos. Este estudo utilizou uma avaliação por micro-TC das articulações metacarpofalângicas (206). Embora não tenha sido observada a presença de erosões ósseas nos indivíduos ACPAs-positivos, o volume ósseo por volume total e a DMO foi significativamente inferior nos indivíduos ACPAs-positivos em comparação com controlos ACPA-negativos, ajustados para o sexo e a idade. Como os ACPAs podem ser detetados no soro vários anos antes do início da artrite reumatoide (29, 207), é provável que o dano ósseo na artrite reumatoide preceda o início clínico da doença através de mecanismos independentes da inflamação.

1.8.3. Regulação da diferenciação osteoblástica

Ao contrário dos osteoclastos, os osteoblastos derivam de células precursoras mesenquimatosas. Na regulação da diferenciação das *stem cells* mesenquimatosas (MSCs) em osteoblastos maduros estão implicados vários fatores, incluindo o *insulin-like growth factor* (IGF) e a paratormona (PTH), que auxiliam na transição de MSCs para células mesenquimatosas do estroma (208). Um aumento na expressão do fator de transcrição pro-osteogénico *runx-related transcription factor 2* (Runx2) compromete as células do estroma com um destino pro-osteogénico, enquanto que a expressão do fator de transcrição osterix promove a diferenciação da célula num osteoblasto maduro. Os osteoblastos maduros produzem colagénio tipo I e proteínas não-colagénicas envolvidas na mineralização óssea, tais como a osteocalcina e a sialoproteína óssea. Esta matriz óssea recém-formada envolve os osteoblastos maduros,

incorporando essas células dentro da matriz óssea como osteócitos completamente diferenciados (159).

As vias de sinalização *wingless* (Wnt) (209) e envolvendo a *bone morphogenetic protein* (BMP) (210), além de modularem o desenvolvimento do esqueleto e a organogênese, são reguladores críticos da diferenciação osteoblástica. A via de sinalização Wnt inclui a via canônica de Wnt/ β -catenina e duas vias não-canônicas, a via Wnt-Cálcio e Wnt-polaridade celular planar (211). Na via canônica de Wnt, Wnts segregados, como o Wnt1 e o Wnt3a, ligam-se e ativam um complexo que inclui as *low-density lipoprotein receptor related proteins* 5 e 6 (LRP5 e LRP6). Estes recetores complexam-se com os co-receptores Frizzled na membrana plasmática para promoverem a estabilização da β -catenina do citosol, permitindo a sua translocação para o núcleo de forma a induzir a transcrição de genes que promovem a diferenciação dos osteoblastos e a formação óssea (211). Foram já identificados vários antagonistas da via Wnt, nomeadamente membros das famílias Dickkopf (DKK) e *secreted frizzled related proteins* (SFRPs) bem como a esclerostina. O DKK-1 estabelece ligações cruzadas com os LRP5/6 e suprime a via de sinalização Wnt nos precursores dos osteoblastos (211). A inibição da expressão do DKK-1 está associada a fenótipos de massa óssea elevada (212), enquanto a expressão excessiva de DKK-1 resulta em osteopenia no Rato (213). Os SFRPs inibem a sinalização Wnt ligando-se diretamente às proteínas Wnt. Nos ratos, a deleção do gene SFRP1 resulta num aumento do volume ósseo (214), enquanto a expressão aumentada tem sido associada à diminuição da DMO (215). Curiosamente, o tecido sinovial inflamado é uma fonte de DKK-1, conduzindo à inibição da formação óssea mediada pelos osteoblastos nas articulações com artrite (216). A expressão de SFRPs no tecido sinovial artrítico é regulada positivamente (217), o que também provavelmente contribui para a inibição da diferenciação dos osteoblastos na artrite inflamatória.

A esclerostina é uma glicoproteína predominantemente, se não exclusivamente, segregada pelos osteócitos, que inibe a via de sinalização Wnt canônica ao ligar-se aos recetores LRP5/6 (218). Mutações com perda de função no ou perto do gene *SOST* (o gene que codifica a esclerostina) foram identificadas em doentes com doença de Van Buchem (219, 220) e esclerosteose (221, 222) (duas doenças associadas a fenótipos de massa óssea elevada). Em ratos, a deleção do gene *SOST* leva a um aumento na formação óssea (223) enquanto a sua expressão excessiva conduz a perda óssea significativa (224).

As *stem cells* mesenquimatosas também exigem a ativação da sinalização BMP para se comprometerem com a linhagem dos osteoblastos. As BMP pertencem à superfamília do *transforming growth factor beta* (TGF- β) e são segregadas principalmente pelos osteoblastos, condrócitos e células endoteliais (210). As BMPs pro-osteogénicas, como as BMPs 2, 4 e 7, ligam-se a recetores membranares, resultando na fosforilação dos SMADs (*transcription factors that*

transduce extracellular TGF- β superfamily ligand signaling) intracelulares 1/5/8. Estes fatores formam complexos com o SMAD4, que sofrem translocação para o núcleo, promovendo a transcrição de genes que respondem às BMPs. Uma variedade de moléculas, incluindo a *noggin* e a esclerostina, foram identificadas como sendo capazes de sequestrar os ligandos das BMPs inibindo assim a sua interação (225). A desregulação da via de sinalização BMP tem sido associada a várias doenças esqueléticas, incluindo ossificação heterotópica, osteoporose e doenças associadas a massa óssea aumentada ou baixa (159).

1.8.4. Reparação das erosões ósseas

Estudos clínicos mostraram que as terapêuticas que reduzem a inflamação das articulações podem retardar ou interromper a progressão da reabsorção óssea mediada por osteoclastos em doentes com artrite reumatoide. No entanto, apesar do tratamento, a reparação das erosões pré-existentes é rara (160). Além disso, a persistência das erosões está associada à perda de cartilagem, pois o osso subcondral, que fornece o suporte para a cartilagem articular, é aquele que é tipicamente erodido. As erosões persistentes demonstraram estar ainda associadas ao declínio funcional, à instabilidade das articulações e a alterações nas forças biomecânicas que atuam sobre as articulações, factos que podem afetar ainda mais a cartilagem articular (159).

Num estudo inicial, por TC de alta resolução, das articulações do punho e das metacarpo-falângicas, aos 12 meses de terapêutica combinada (metotrexato + agente anti-TNF α), demonstrou-se que, embora a interrupção da progressão das erosões tenha sido conseguida, a reparação das erosões foi um evento raro (226). Posteriormente, foi verificado, numa coorte de doentes com artrite reumatoide, que apesar da bioterapia diminuir significativamente os *scores* de sinovite, obtidos por RM, todos os doentes apresentavam sinovite remanescente após 12 meses de tratamento (227). Este mesmo estudo mostrou ainda que a reparação de erosões só ocorreu em 6% dos doentes tratados com adalimumab, sugerindo que a persistência de inflamação residual pode prejudicar a função osteoblástica e a consequente reparação das erosões (227).

Um outro estudo, com recurso a micro-TC de alta resolução e com um ano de seguimento, avaliou o grau de progressão das erosões nas articulações metacarpo-falângicas (em termos de largura e profundidade): quer nos doentes com artrite reumatoide tratados com inibidores do TNF α em associação com o metotrexato, quer nos doentes tratados com metotrexato em monoterapia, obtiveram-se resultados sobreponíveis aos estudos anteriores (228). A reparação das erosões mostrou-se muito limitada e todas as erosões puderam ainda ser identificadas após o tratamento. No entanto, a profundidade média das erosões diminuiu significativamente 0,1 mm (o tamanho médio da erosão foi de 2,4 mm) nos doentes tratados com a associação de

fármacos (inibidor do TNF α e metotrexato) *versus* os controlos (metotrexato em monoterapia). As erosões mais profundas e já com sinais de esclerose na base foram as mais propensas a reparação em comparação com as erosões mais rasas (228). Estes estudos foram alargados de forma a avaliar doentes com artrite reumatoide tratados com inibidores do IL6R (229). Assim, e recorrendo a técnicas de micro-TC, foram avaliadas as erosões ósseas isoladas, presentes nas articulações metacarpo-falângicas, no início e 1 ano após o tratamento. Neste estudo, a largura (em oposição à profundidade) das erosões diminuiu significativamente 0,11 mm (o tamanho médio da erosão foi de 2,23 mm). No entanto, também todas as erosões puderam ser visualizadas 1 ano depois, sugerindo que o bloqueio do IL6R também não conduz a uma reparação substancial das erosões ósseas dentro deste período de tempo (229).

1.8.5. Inibição da função osteoblástica

Muitos estudos parecem sugerir que as citocinas pró-inflamatórias não só promovem a osteoclastogénese mas também contribuem para a perda óssea pela inibição da diferenciação dos osteoblastos. O TNF α é um potente inibidor da diferenciação dos osteoblastos *in vitro* (230). O TNF α induz também a degradação do Runx2, um fator de transcrição essencial para a diferenciação dos osteoblastos (231). Esta degradação do Runx2 induzida pelo TNF α é mediada por regulação positiva dos Smurf1 e Smurf2 (*ubiquitin-protein ligase*) (232). Além disso, o tratamento de células precursoras dos osteoblastos com doses elevadas de TNF α induz a sua apoptose (233). Por outro lado, a exposição de culturas de osteoblastos à IL1 mostrou também inibir a formação de nódulos mineralizados, a síntese de proteínas de colagénio e a replicação celular (234). A IL1 prejudica o recrutamento e a migração de osteoblastos através de fatores quimiotáticos (235). Além disso, a interação da IL6 com o sIL6R provoca nos osteoblastos um aumento na síntese de prostaglandina E2 e uma redução na razão OPG/RANKL, promovendo assim a diferenciação de osteoclastos (236). Assim, estes estudos *in vitro* demonstram que as citocinas pró-inflamatórias influenciam o osteoblasto, impedindo a sua diferenciação e/ou função e, em alguns casos, condiciona-os a estimular a diferenciação dos osteoclastos (159). Posteriormente, surgiram diversos estudos a demonstrar *in vivo* a capacidade de a inflamação articular inibir a diferenciação e a função dos osteoblastos. Assim, no modelo animal K/BxN, a taxa de formação de osso nos locais de erosão foi avaliada por histomorfometria dinâmica (237), observando-se uma diminuição significativa da taxa de formação de osso nas superfícies ósseas adjacentes à inflamação em comparação com as superfícies ósseas adjacentes à medula óssea normal. Além disso, nos sítios de erosão articular e na sua vizinhança, verificou-se uma total ausência de células que expressassem marcadores de linhagem osteoblástica em fase tardia (osteoblastos maduros). Esses achados demonstraram que a inflamação sinovial inibe a

capacidade de os osteoblastos maturarem e formarem osso mineralizado (237). Estudos num outro modelo animal de artrite, o hTNFtg, mostraram que as células da sinovial inflamada produzem DKK-1, o antagonista da via de sinalização Wnt, impedindo a formação de osso mediada por osteoblastos (216). Além disso, neste mesmo modelo, o TNF α mostrou-se capaz de aumentar a expressão de DKK-1 em fibroblastos sinoviais e nos osteoblastos. A administração dum anticorpo neutralizante do DKK-1, no início do processo inflamatório, conduziu a uma ausência de aparecimento de erosões articulares nos seus locais típicos, apesar da presença concomitante de inflamação articular (159). No entanto, o bloqueio do DKK-1 também conduziu a uma regulação positiva da OPG, levantando a questão de a ausência de erosões neste contexto ser também devida a uma inibição da atividade do RANKL. Contudo, a histomorfometria realizada na superfície periosteal do osso mostrou não só um aumento da taxa de formação de osso com o bloqueio do DKK-1, mas também um aumento no número dos osteoblastos e da deposição de osteóide nos ratos com artrite tratados com o anticorpo neutralizante do DKK-1 *versus* os controlos. Assim, a erosão está essencialmente ausente após o bloqueio do DKK-1 e, em vez disso, ocorre a formação de osso periosteal, o que não é uma característica habitual do modelo animal hTNFtg, sugerindo que a formação de osso periosteal é inibida pelo DKK-1 (159). Na verdade, os estudos clínicos acabaram por validar a relevância do DKK-1 na remodelagem óssea nas articulações com artrite. Os níveis séricos de DKK-1 assim como a expressão de DKK-1 na sinovial inflamada encontram-se significativamente aumentados em doentes com artrite reumatoide quando comparados com controlos saudáveis (216). Mais recentemente, foram identificados três SNPs do gene que codifica o DKK-1 que se associam a um aumento da produção de DKK-1 funcional (detetável através de níveis séricos aumentados), bem como a uma maior progressão da destruição articular em doentes com artrite reumatoide (238). Todos estes estudos ilustram o forte impacto do DKK-1, um antagonista da via Wnt, na inibição do osteoblasto no contexto da artrite.

No modelo animal K/BxN foi possível identificar outros antagonistas da via de sinalização Wnt, nomeadamente outros membros da família DKK e os SFRPs 1 e 2, com expressão aumentada na sinovial inflamada (217, 237). Neste modelo, em primeiro lugar, os investigadores induziram a inflamação articular e, posteriormente, permitiram que esta se resolvesse. Assim, recorrendo a técnicas de histomorfometria dinâmica e à micro-TC, conseguiram demonstrar que após a resolução da inflamação os osteoblastos maduros povoavam as erosões ósseas e a formação óssea era induzida nesses locais, seguida duma reparação das erosões (217, 237). Nomeadamente, com a inflamação sinovial quase completamente resolvida, verificou-se uma franca diminuição da expressão dos antagonistas de Wnt (SFRPs 1 e 2) e uma expressão aumentada de um agonista da via Wnt (o Wnt10b) em comparação com a sinovial com artrite.

Estes achados demonstraram que é necessária uma resolução significativa da inflamação para promover a via de sinalização Wnt e para ocorrer a reparação da erosão na articulação com artrite (217, 237). Assim, as células da sinovial inflamada segregam fatores que antagonizam a via de sinalização Wnt e inibem a diferenciação osteoblástica e, consequentemente, a formação óssea mediada pelos osteoblastos (159).

Recentemente, os agonistas da via de sinalização Wnt foram também propostos como terapêuticas possíveis para evitar a destruição articular associada ao envelhecimento e à inflamação, nomeadamente o Wnt4, um agonista da via Wnt não-canónica (159).

A esclerostina é um outro antagonista da via de sinalização Wnt, que tem sido muito implicada no processo de formação óssea na espondilite anquilosante. No modelo animal hTNFtg, o bloqueio da esclerostina mostrou ser capaz de inibir localmente, ou seja, nas articulações inflamadas, os danos ósseo e cartilágneo (239). Portanto, a inibição da esclerostina pode ser outro mecanismo para atenuar as erosões ósseas observadas na artrite inflamatória erosiva.

2. Gene do LRP5 e o osso

Nos últimos anos, através de estudos de genética humana, têm sido crescentes as evidências de que o LRP5 está envolvido na regulação da homeostasia do osso, nomeadamente porque foram encontradas mutações patogénicas do LRP5 em doenças monogénicas com distúrbios da DMO. Por um lado, a síndrome de osteoporose e pseudoglioma (OPPG), em que a osteoporose resulta duma perda de função do LRP5; por outro lado, mutações do LRP5 com ganho de função causam doenças com aumento da DMO (240). A nível molecular, estes tipos de mutações resultam numa perturbação na atividade da via de sinalização Wnt canónica (diminuída e aumentada, respetivamente), que, por sua vez, constitui uma importante via metabólica dos osteoblastos durante as osteogénese embrionária e pós-natal (240). Esta cascata de sinalização é ativada pela ligação do ligando Wnt ao complexo-recetor Frizzled/LRP5. Além do envolvimento do LRP5 em condições patológicas com fenótipos ósseos extremos, a variabilidade neste gene, localizado no cromossoma 11q12–13, mostrou também contribuir para a determinação da DMO na população geral. Vários estudos já demonstraram que variantes polimórficas comuns no gene do LRP5 estão associadas à DMO e consequentemente à osteoporose (240). Esses estudos genéticos juntamente com os resultados obtidos a partir de estudos *in vitro* e *in vivo* vieram enfatizar a importância do LRP5 e da via de sinalização Wnt canónica na regulação da homeostasia do osso.

2.1. LRP5 e doenças ósseas monogénicas

A síndrome de OPPG é um distúrbio genético raro de hereditariedade autossómica recessiva. Caracteriza-se por uma osteoporose grave de início juvenil, que conduz a deformidades ósseas e fraturas recorrentes, assim como a uma amaurose congénita ou de início infantil com uma gravidade variando de *phthisis bulbi* a displasia vítreo-retiniana (241). Também se associa a uma expressão variável de atraso mental, hipotonia muscular e laxidez ligamentar. A avaliação bioquímica não revela defeitos relacionados com a síntese do colagénio, a homeostasia do cálcio, as hormonas anabolizantes e catabolizantes, o crescimento endocondral ou a remodelagem óssea (241, 242). Embora os portadores heterozigotos desta síndrome tenham sido considerados fenotipicamente normais, vários estudos mostraram a presença de uma diminuição da massa óssea, quando comparados com controlos emparelhados para a idade e sexo, assim como um aumento do risco de fraturas osteoporóticas. No entanto, anomalias oculares nunca foram reportadas em portadores heterozigotos da síndrome OPPG (243, 244). Em 2001, o defeito genético que causa a síndrome de OPPG foi desvendado, com a identificação de mutações com perda de função no gene LRP5, em heterozigotia e homozigotia (243). Até ao momento, 48 mutações do LRP5 relacionadas com a síndrome OPPG foram relatadas na literatura (243, 245). Cerca de 54% delas são mutações deletérias (*nonsense*, *frameshift* e do sítio de *splicing*), enquanto as restantes 46% consistem em variantes *missense*. As mutações da síndrome OPPG encontram-se espalhadas por toda a proteína transmembranar; no entanto, mais de 90% estão localizadas no domínio extracelular, que abrange a maior parte da proteína. Dentro desta porção extracelular, verifica-se, especialmente para as substituições de aminoácidos, um agrupamento das mutações no segundo domínio *β -propeller* dos quatro domínios *β -propeller* presentes nesta proteína (240).

Por outro lado, estudos genéticos em duas famílias caucasianas (não relacionadas entre si) e com um fenótipo de DMO elevada com hereditariedade autossómica dominante revelaram que mutações ativadoras do LRP5 resultam em doenças com massa óssea aumentada (246, 247). O exame radiográfico dos membros das famílias afetados pela doença revelou a presença de ossos mais densos, com espessamento da cortical; as medições por DXA mostraram *scores z* de DMO consistentemente mais elevados quando comparados com os dos familiares não afetados. Os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo eram normais (246, 247). Se uns doentes (247) eram assintomáticos e não sofreram complicações clínicas secundárias ao aumento da massa óssea, outros (246) apresentavam sintomas clínicos de *torus palatinus* e uma mandíbula alargada e profunda. Estudos de *linkage* mapearam o gene associado à doença (em ambas as famílias) para a região do cromossoma 11q12-13 (246). Posteriormente, identificou-se em ambas as famílias a mesma mutação *missense* heterozigota, localizada no exão 3 do gene do

LRP5, que resulta na substituição de aminoácidos G171V (246, 247). Nos anos seguintes, constatou-se que doentes inicialmente diagnosticados com hiperostose endosteal, doença de Worth, Doença de van Buchem, osteosclerose autossômica dominante ou osteopetrose autossômica de tipo I eram heterozigotos portadores de mutações *missense* ativadoras do gene LRP5 (248-250). O fenótipo ósseo, com ossos densos e hiperostose cortical, afetando principalmente os ossos do crânio e os ossos tubulares, é comum a todos os doentes descritos. As complicações clínicas secundárias a este crescimento ósseo exagerado são muito variáveis, desde casos assintomáticos sem fenótipo clínico óbvio até à presença de sintomas relativamente leves a graves de mandíbula alargada e profunda, *torus palatinus*, compressão de nervos cranianos, craniossinostose e atraso no desenvolvimento (240). Curiosamente, todas as mutações do gene LRP5 associadas a aumento da DMO são agrupadas no primeiro domínio β -*propeller* (240). No entanto, a natureza da mutação não prevê o fenótipo clínico, como já foi verificado para a mutação G171V. Inclusivamente, dentro da mesma família e para a mutação A214T, a penetrância da craniossinostose e do atraso de desenvolvimento é altamente variável (249).

2.2. LRP5 e osteoporose

A osteoporose é uma doença multifatorial complexa caracterizada por uma diminuição da DMO, uma deterioração da microarquitetura do tecido ósseo e um aumento do risco de fratura. Os fatores genéticos têm sido reconhecidos desde há muito tempo como determinantes importantes da osteoporose e de outros fenótipos ósseos associados, bem como da DMO e do risco de fratura. Os estudos de heritabilidade sugerem que cerca de 80% da variância na DMO é geneticamente determinada (251, 252). Na maioria dos casos, a osteoporose está relacionada com uma variedade de fatores de risco como a idade, a menopausa, as doenças crónicas e os fármacos. Contudo, a osteoporose primária ou idiopática, aquela em que nenhum desses fatores está presente, é menos comumente reconhecida (253, 254). O mecanismo que lhe é subjacente é amplamente desconhecido e os genes envolvidos continuam por identificar. Vários autores sugerem um papel importante para os defeitos genéticos nesta condição médica, pois a prevalência de baixa massa óssea em familiares de primeiro grau destes doentes é significativamente maior *versus* os controlos (255, 256).

Assim, num estudo genético (257) em 20 doentes pediátricos com osteoporose primária identificaram-se três variantes heterozigóticas de mutações no gene do LRP5: A29T e R1036Q, localizadas, respetivamente, no primeiro e quarto domínios β -*propeller*, e C913fs na terceira repetição semelhante ao *epidermal growth factor* (EGF) do gene LRP5. As três crianças afetadas tinham a história de pelo menos uma fratura periférica, duas delas sofreram fraturas de

compressão graves, duas tinham *scores* Z da coluna lombar baixos e nenhuma apresentava quaisquer manifestações oculares. Um estudo semelhante, numa coorte de 66 doentes do sexo masculino com osteoporose idiopática, com idades entre os 20 e os 65 anos e com um *score* Z de $DMO \leq -2,0$ na coluna lombar ou no fémur proximal, revelou a presença de 3 variantes *missense* distintas do gene LRP5 em heterozigotia (S356L (segundo *β -propeller*), S455L (segundo *β -propeller*) e A1537T (cauda citoplasmática) (258). Curiosamente, as variantes S356L e C913fs foram previamente descritas em doentes heterozigotos compostos com a síndrome OPGG (245), indicando que essas variantes levam à perda de função. Contudo, devido à sua baixa frequência em diferentes coortes, as mutações do gene do LRP5 não podem ser consideradas uma causa importante de osteoporose idiopática.

2.3. LRP5, densidade mineral óssea e risco de fratura na população geral

Após a descoberta do LRP5 como um ator importante no metabolismo ósseo, surgiu um grande interesse em avaliar o seu papel como gene de suscetibilidade na regulação da DMO e/ou risco de fratura na população em geral. Assim, realizaram-se múltiplos estudos de associação entre SNPs do LRP5 e diferentes fenótipos ósseos (259-265). No geral, estes estudos mostraram que o bloco haplotípico distal do gene do LRP5, que engloba os exões 8-21 é de particular importância para a variância da massa óssea (259, 260). Neste bloco sobressaem especificamente dois SNPs, o V667M (exão 9; terceiro *β -propeller*) e o A1330V (exão 18; repetição LDL). Em populações caucasianas, o polimorfismo V667M parece estar significativamente associado a vários parâmetros da coluna lombar (DMO por área, conteúdo mineral ósseo e área óssea) e à estatura em adultos (262), e apenas marginalmente associado à osteoporose masculina idiopática (261). No entanto, não foram observadas quaisquer associações com a DMO na coluna lombar e no colo do fémur em mulheres pré-menopáusicas (259). Para o polimorfismo A1330V, observou-se uma associação estatisticamente significativa com a DMO na anca e na coluna lombar numa coorte osteoporótica britânica (263), assim como associações positivas com a DMO lombar e do colo femoral em mulheres caucasianas pré-menopáusicas e homens caucasianos com osteoporose idiopática (259, 261). Nos participantes no estudo de Roterdão, o SNP A1330V também se associou significativamente à DMO lombar, à área óssea lombar e à largura do colo femoral (260). No entanto, uma série de estudos não conseguiram confirmar a associação do SNP A1330V com parâmetros ósseos nas suas coortes (240). Os SNPs V667M e A1330V do gene LRP5 envolvem substituições de aminoácidos e potencialmente podem ter importantes repercussões funcionais. Até agora, nenhum estudo reportou os significados funcionais destes SNPs (à excepção dum único estudo recente e em

relação ao SNP A1330V do gene LRP5) (266). Assim, não podemos excluir que outros SNPs em desequilíbrio de *linkage* com estes possam ser a causa dos efeitos observados na DMO.

Em suma, uma série de conclusões interessantes podem ser extraídas dos estudos de associação genética com o gene do LRP5. Em primeiro lugar, a variabilidade genética do LRP5 está associada não apenas à DMO, mas também ao risco de fratura em idade avançada. Assim foram encontradas associações com o risco de fratura numa grande coorte de mulheres australianas idosas (264) e em homens de idade avançada que participaram no estudo de Rotorã (260). Em segundo lugar, os dados publicados sugerem que as variantes do gene LRP5 contribuem também para a variação na DMO, quer em indivíduos jovens, portanto influenciando a aquisição do pico de massa óssea (259, 267, 268), quer nos idosos, em que a variação na DMO se deve principalmente à combinação dos efeitos genéticos no pico de massa óssea e da perda óssea relacionada com a idade (260-264). Em terceiro lugar, os efeitos dos polimorfismos genéticos do LRP5 nos fenótipos ósseos, nomeadamente na DMO da coluna lombar e do colo do fémur, no conteúdo mineral ósseo da coluna lombar, na área óssea, na estatura e no risco de fratura, são consistentemente mais fortes nos homens quando comparados com as mulheres (260, 262, 263). Embora não seja possível uma explicação clara, sabe-se que existem diferenças específicas nas hormonas sexuais (como androgénios e estrogénios) durante a puberdade, período durante o qual são estabelecidas as diferenças na largura e estatura ósseas, que podem afetar direta ou indiretamente a ação do LRP5 nos fenótipos ósseos. Por outro lado, estas diferenças de magnitude no efeito podem ser explicadas pelas diferenças de género em termos de sobrecarga mecânica. Na verdade, também foi demonstrado que os SNPs V667M e A1330V do LRP5 estão especificamente associados com o pico de massa óssea da coluna lombar no subgrupo fisicamente ativo de homens jovens dinamarqueses do estudo Odense Androgen, sugerindo que o LRP5 tem um papel mediador da formação óssea induzida pela carga (265).

2.4. Aspetos funcionais do LRP5

A proteína LRP5 pertence à família de recetores da superfície celular do recetor para as LDL (LDLR) (269, 270). O gene LRP5 abrange aproximadamente 136 kb; contém 23 exões e codifica uma proteína de 1516 aminoácidos, constituída por um grande domínio extracelular, um único domínio transmembranar e uma cauda citoplasmática. A fração extracelular é constituída por um peptídeo de sinal, seguido de uma série de quatro domínios *β -propeller*, contendo tipicamente seis motivos de YWTD, que formam uma estrutura semelhante a *six-bladed β -propeller*. Esses domínios são seguidos por um domínio repetido semelhante ao EGF. Além disso, três domínios LDLR flanqueiam o segmento transmembranar de 23 aminoácidos. O LRP5 desempenha um papel importante na via de sinalização Wnt canónica porque atua como um

coreceptor, conjuntamente com o Frizzled, para as proteínas Wnt, regulando a transdução de sinal intracelular através da β -catenina (271). A ativação desta via resulta numa acumulação intracitoplasmática de β -catenina. Posteriormente, a β -catenina sofre translocação para o núcleo e associa-se aos factores de transcrição *T-cell transcription factor* (TCF) e *lymphoid enhancer binding factor* (LEF) que regulam a transcrição de genes alvo (272). A cascata de transdução de sinal Wnt canónica regula uma série de atividades celulares e fisiológicas importantes para o desenvolvimento e a morfogénese (273). Além disso, a desregulação desta via foi associada à génese tumoral (240). O seu papel na diferenciação e/ou função dos osteoblastos e, conseqüentemente, no anabolismo ósseo, foi confirmado em modelos *in vitro* e *in vivo* (240).

As variantes deletérias do LRP5, como se observa na maioria dos doentes com a síndrome de OPPG, que codificam proteínas truncadas que podem até não ser sequer sintetizadas *in vivo* devido à decomposição de ARNm *nonsense*, resultam numa DMO diminuída devido a uma diminuição do sinal Wnt canónico (243). Estas mutações não são as mais úteis para os estudos que tentam correlacionar o tipo e a posição das mutações do LRP5 com os fenótipos ósseos observados. As mutações *missense* da síndrome de OPPG têm mais interesse, porque comprometem funcionalmente o LRP5. Elas agrupam-se no segundo domínio *β -propeller*, prejudicando nestes casos a transmissão de sinal Wnt através duma diminuição da capacidade de ligação ao ligando Wnt (274). Por outro lado, todas as mutações de ativação do LRP5, associadas a um aumento da DMO, agrupam-se no primeiro domínio *β -propeller* e parecem prejudicar a inibição extracelular do sinal Wnt canónico mediada pelo DKK-1 (275). No entanto, isto entra em conflito com evidências anteriores que indicam que as ligações entre os DKKs e o LRP5 ocorriam no terceiro domínio *β -propeller* (274); contudo, estes factos não excluem necessariamente as observações anteriores. Por outro lado, e posteriormente, descobriu-se um outro antagonista da via de sinalização Wnt canónica, a esclerostina, derivada dos osteócitos e capaz de inibir a formação de osso através da ligação ao primeiro e/ou segundo domínios *β -propeller* do LRP5 (218). A esclerostina foi identificada como ausente na esclerosteose e na doença de Van Buchem, duas displasias ósseas esclerosantes clínica e radiologicamente relacionadas (220, 221, 276). O seu papel antagonista da formação de osso foi corroborado pela evidência de que sua ligação ao LRP5 fica comprometida pela mutação G171V, conduzindo a um aumento do sinal Wnt canónico pela ausência de inibição desse sinal, que é mediada pela esclerostina (277). Um efeito semelhante já foi demonstrado para outras variantes genéticas *missense* do LRP5 (240).

3. Serotonina e osso

Evidências recentes indicam que a serotonina é um poderoso regulador inibitório da osteoblastogénese (278). A serotonina é produzida no sistema nervoso central (SNC) e no trato gastrointestinal pelas enzimas *tryptophan hydroxylase* 2 e 1 (Tph2 e Tph1), respetivamente (279). Estas enzimas são responsáveis pela hidroxilação do triptofano e são as limitantes da taxa de síntese da serotonina. Como a serotonina não atravessa a barreira hematoencefálica, a serotonina sintetizada no cérebro e a serotonina sintetizada no intestino possuem funções biológicas distintas. A serotonina sintetizada no cérebro é um neurotransmissor importante no SNC e está envolvida na regulação do humor e do apetite (280). Curiosamente, a serotonina sintetizada no cérebro mostrou favorecer a formação óssea através da regulação do tono simpático (281, 282). A serotonina sintetizada no intestino é produzida pelas células enterocromafins, principalmente no duodeno, e aí participa na regulação da motilidade intestinal. Posteriormente, a serotonina sintetizada no intestino entra na circulação sanguínea, onde é absorvida pelas plaquetas, sendo libertada quando as plaquetas são ativadas, exibindo fortes propriedades vasoconstritoras. No entanto, uma pequena quantidade da serotonina sintetizada no intestino (aproximadamente 5%) permanece livre na circulação. Recentemente, foi demonstrado um papel endócrino para esta fração circulante. Assim, a serotonina liga-se ao recetor da serotonina Htr1b (*5-hydroxytryptamine receptor 1B*), que se encontra na superfície dos osteoblastos, provocando uma diminuição da fosforilação do CREB (*cAMP response element-binding protein*) e, consequentemente, uma diminuição da proliferação dos osteoblastos (278). Além disso, no Rato, a inibição farmacológica da Tph1 mostrou diminuir os níveis de serotonina derivada do intestino e aumentar a massa óssea, indiciando um papel fundamental da serotonina como molécula freio da osteoblastogénese e da formação óssea (283). Estes dados indicam a existência de um eixo intestino-osso, previamente desconhecido, e com implicações biológicas significativas (278, 284).

Por outro lado, existem algumas evidências de que o LRP5 regula a massa óssea, pelo menos em parte, modulando os níveis circulantes da serotonina derivada do intestino (278). Este efeito esquelético indireto do LRP5 (independente da via de sinalização Wnt/ β -Catenina canónica) não exclui a presença dos efeitos diretos dependentes desta via, que estão envolvidos, nomeadamente, na resposta anabólica do osso à sobrecarga mecânica (285) e em algumas mutações do LRP5 que acarretam ganho de função (286). Efetivamente, em 2008, demonstrou-se, no Rato, que a expressão específica no intestino do *complementary DNA* (cDNA) de um gene LRP5 mutante causador dum fenótipo de massa óssea aumentada conduzia a uma diminuição dos níveis séricos de serotonina através da inibição da expressão de Tph1 (278). Além disso, dados clínicos e epidemiológicos indicam que a serotonina derivada do intestino poderá ter uma

função biológica semelhante no Homem. Tem-se acumulado evidência no sentido de que níveis elevados de serotonina derivada do intestino parecem aumentar a probabilidade de desenvolver osteoporose (287). Vários autores descreveram, em doentes com mutações do LRP5 causadoras dum fenótipo de massa óssea aumentada, face a controlos emparelhados para o sexo e a idade, a presença de níveis significativamente inferiores de serotonina no plasma pobre em plaquetas (278, 288, 289). Paralelamente, existem vários relatos na literatura de doentes com a síndrome OPPG com aumento ligeiro a marcado nos níveis circulantes de serotonina (278, 290). Adicionalmente, vários estudos epidemiológicos indicam que os inibidores seletivos da recaptção da serotonina (ISRSs), amplamente utilizados nos dias de hoje, se podem associar a um risco aumentado de osteoporose e de fraturas. Embora o mecanismo explicativo não seja totalmente conhecido, pensa-se que os ISRSs possam aumentar os níveis de serotonina no micro-ambiente ósseo e assim inibir a osteoblastogénese (291-293). Paralelamente, sabe-se que os doentes com artrite reumatoide apresentam níveis aumentados de serotonina (294) e que este facto pode estar associado à perda excessiva de osso, tão característica desta doença.

OBJECTIVOS

Numa perspetiva atual, o tratamento da artrite reumatoide vai muito além do controlo/supressão da inflamação (remissão clínica ou baixa atividade da doença como alvos terapêuticos) a fim de minimizar a destruição articular e garantir a maior funcionalidade possível para o doente. Hoje em dia, o tratamento da doença tem como objetivo evitar ou prevenir uma série de comorbilidades, nomeadamente o dano cardiovascular, o dano osteoarticular (destruição do osso/erosões ósseas, perda de osso peri-articular e perda sistémica de osso /osteoporose), o dano intersticial pulmonar, o dano do sistema nervoso central (depressão, sensibilização central da dor, dor neuropática e distúrbios do sono), a fadiga e as perturbações da qualidade de vida do doente. Além disso, e em termos de metabolismo ósseo no contexto da artrite reumatoide, saímos dum paradigma muito centrado no osteoclasto e assistimos ao aparecimento de novas centralidades, nomeadamente o osteoblasto e o osteócito, assim como à emergência de novas vias de sinalização a eles associadas, nomeadamente a via de sinalização Wnt/LRP5/ β -catenina canónica.

Assim e face a tudo o que foi exposto na introdução, onde é notória a partilha, quer de mediadores, quer de vias de sinalização, decidimos estudar, em paralelo, alguns aspetos menos bem esclarecidos do dano cardiovascular e do dano osteoarticular na artrite reumatoide.

Na presente dissertação, intitulada "Via de sinalização Wnt/LRP5/ β -catenina e dano na artrite reumatoide" pretendemos responder aos quatro seguintes objetivos.

1. Relativamente ao dano cardiovascular na artrite reumatoide

A. Qual a prevalência de defeitos de perfusão miocárdica em doentes com artrite reumatoide estabelecida e assintomáticos para doença cardiovascular? Como é que esses resultados se relacionam com as várias características antropométricas, clínicas e de terapêutica assim como com os diversos fatores de risco cardiovascular tradicionais e não tradicionais?

B. Qual a prevalência da calcificação coronária, avaliada por TC, em doentes com artrite reumatoide estabelecida e assintomáticos para doença cardiovascular? Como é que esses resultados se relacionam com as várias características antropométricas, clínicas e de terapêutica, assim como com os diversos fatores de risco ateroscleróticos tradicionais e não tradicionais, com a densidade mineral óssea e o metabolismo ósseo?

2. Relativamente ao dano ósseo na artrite reumatoide

C. Quais as frequências genotípicas de 3 variantes polimórficas (p.A1330V, p.N740N e p.V667M) do gene LRP5 em doentes portugueses com artrite reumatoide? Quais as associações entre estas 3 variantes polimórficas do gene LRP5 e o dano ósseo (quer em termos de gravidade da destruição articular pela doença quer em termos de perda de massa óssea), em doentes com artrite reumatoide?

D. Quais os níveis de serotonina em doentes portugueses com artrite reumatoide estabelecida? Como é que esses resultados se relacionam com as várias características antropométricas, clínicas e de terapêutica, assim como com a densidade mineral óssea e o metabolismo ósseo?

PROJETO DE INVESTIGAÇÃO – METODOLOGIA EXPERIMENTAL

1. Material e métodos

Seguidamente, apresenta-se, de forma simplificada, a população selecionada e a metodologia utilizada nos trabalhos efetuados, encontrando-se a descrição pormenorizada dos mesmos nas respetivas publicações.

O projeto de investigação foi submetido à apreciação pela Comissão de Ética para a Saúde do Centro Hospitalar de São João do Porto e foi aprovado a 13 de março de 2008, tendo sido obtido o consentimento informado escrito de todos os doentes observados, de acordo com as normas da Declaração de Helsínquia de 1975 (295).

2. População

Incluímos, como população alvo da investigação, doentes com artrite reumatoide estabelecida, do universo de doentes em seguimento e previamente agendados, quer para a consulta externa de Reumatologia Geral, quer para a consulta de Apoio ao Hospital de Dia de Reumatologia (aqui, os sob agentes biotecnológicos), durante um período de seis meses consecutivos. Os critérios de exclusão foram a presença de história prévia de doença cardíaca isquémica, angina, insuficiência cardíaca e/ou ondas Q no electrocardiograma da visita basal do estudo. A artrite reumatoide foi diagnosticada de acordo com os critérios de classificação de doença definitiva do ACR de 1987 (47). Encontrámos 216 doentes elegíveis para o estudo nessa janela temporal. Todos os dados clínicos disponíveis no processo clínico do doente, referentes à artrite reumatoide e às comorbilidades, foram recolhidos, incluindo também as terapêuticas prévias e em curso [como fármacos cardiovasculares, anti-inflamatórios (esteroides e não-esteroides) ou imunossupressores]. A hipertensão foi definida na presença de uma pressão arterial sistólica ≥ 140 mmHg, uma pressão arterial diastólica ≥ 90 mmHg ou pelo facto de se encontrar sob medicação anti-hipertensiva. A dislipidemia foi definida perante um colesterol total ≥ 200 mg/dL ou pela toma de fármacos anti-dislipidémicos. A diabetes foi estabelecida pela documentação duma glicemia em jejum ≥ 126 mg/dL ou pela toma de agentes hipoglicemiantes (153, 296, 297). Durante a visita médica, a actividade da doença reumática inflamatória crónica foi medida usando o DAS28 com quatro variáveis [DAS28(4v)] (52). Outras medidas de atividade da doença como o DAS28(4v) com a PCR, como marcador de fase aguda e em vez da VS, e o DAS28 três variáveis, com VS e com PCR, foram também calculados aquando da visita médica. Os doentes preencheram também a versão portuguesa do HAQ, um instrumento de rotina, utilizado habitualmente para avaliar a capacidade funcional dos doentes reumatoides (298).

3. Avaliação laboratorial

Entre as 08:00 e as 10:00 da manhã, procedeu-se à recolha de uma amostra de sangue periférico, em jejum, para avaliar parâmetros analíticos de rotina, relacionados com a doença reumatoide (o hemograma, a VS, a PCR, os auto-anticorpos FR e ACPAs), com o metabolismo ósseo [a creatinina, o cálcio total, o fósforo, a fosfatase alcalina, a 25 (OH) vitamina D3, a PTH intacta, a osteocalcina e o *beta-carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen* (β -CTX)] e com o perfil de risco cardiovascular [o *brain natriuretic peptide* (BNP), o perfil lipídico, a homocisteína, o ácido fólico, o ácido úrico, a glicose e a insulina]. No perfil lipídico incluímos as seguintes determinações: colesterol HDL, colesterol LDL, colesterol total, triglicerídeos, lipoproteína (a), ApoA1 e ApoB. Estes doseamentos bioquímicos de rotina foram efetuados no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar de São João do Porto. Nas 48 horas que antecederam a colheita de sangue periférico, foi solicitado aos doentes com artrite reumatoide uma dieta restritiva específica [evicção dos seguintes alimentos e bebidas: chá, café, chocolate, abacate, banana, tomate, ameixa, noz, beringela, abacaxi, citrinos e alimentos ricos em baunilha (nomeadamente doces de pastelaria)], assim como a abstinência da toma de paracetamol ou medicamentos contra a tosse. A colheita de sangue permitiu a separação de soro/plasma para as quantificações de rotina acima descritas como também o armazenamento de amostras (a -70°C) para determinar, posteriormente e recorrendo a técnicas de ELISA, os níveis de outros cinco biomarcadores não de rotina (serotonina, OPG, RANKL, DKK-1 e esclerostina). Estes doseamentos foram realizados no Laboratório Nobre da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, pela Dra Conceição Gonçalves, sob a orientação da Prof. Doutora Maria João Martins. As amostras foram testadas em duplicado, de acordo com as instruções do fabricante. A serotonina sérica foi doseada com recurso a um kit da Labor Diagnostika Nord GmbH & Co, KG (Nordhorn, Alemanha); os coeficientes de variação intra e inter-ensaio foram de 3,9-5,4% e 6,0%, respetivamente. Os níveis séricos de OPG e de DKK-1 foram determinados utilizando dois kits da BIOMEDICA (Viena, Áustria): os coeficientes de variação intra-ensaio foram $\leq 3\%$ para ambos e os coeficientes de variação inter-ensaio foram $\leq 3\%$ para o DKK-1 e entre 3 e 5% para a OPG. Os níveis séricos de RANKL foram quantificados utilizando-se um kit da CUSABIO (Wuhan, China) para o efeito; o coeficiente de variação intra-ensaio foi $< 8\%$ e o de variação inter-ensaio foi $< 10\%$. A esclerostina sérica foi doseada com recurso a um kit da TECO (Sissach, Suíça); coeficientes de variação intra e inter-ensaio foram de 3,8-8,0% e 3,3-9,0%, respetivamente. A resistência à insulina foi calculada recorrendo ao *Homeostasis Model Assessment* (HOMA IR), usando a fórmula: $HOMA\ IR = [insulina\ em\ jejum\ (mUI/L) \times glicemia\ em\ jejum\ (mg/dL)] / 405$ (299).

4. Genotipagem

GENOTIPAGEM

Para o estudo recorreu-se ao ADN extraído de sangue periférico por intermédio do *MagNA Pure LC DNA Isolation Kit – Roche®*. O ADN obtido foi de seguida quantificado através do método espectrofotométrico (NanoDrop2000c). Foram desenhados *primers* para 3 regiões polimórficas no gene LRP5, que se apresentam abaixo.

LRP5 V667M - ENSG00000162337 (exão 9)

CTGGAGCCTCTGTGTTGCTTCCAGGAACCAACCCGTGTGCGGACAGGAACGGGGGGTGCAGCCACCTGTGC
TTCTTCACACCCACGCAACCCGGTGTGGCTGCCCCATCGGCCTGGAGCTGCTGAGTGACATGAAGACCTGCA
TCGTGCCTGAGGCCTTCTTGGTCTTCACCAGCAGAGCCGCCATCCACAGGATCTCCCTCGAGACCAATAACAA
CGACVTGGCCATCCCGCTCACGGGCGTCAAGGAGGCCTCAGCCCTGGACTTTGATGTGTCCAACAACCACATC
TACTGGACAGACGTACGCCTGAAGGTAGCGTGGGCCAGAACGTGCACACAGGCAGCCTTTATGGGAAAACCT
TGCCTCTGTTCTGCCTCAAAGGCTTCAGACACTTTTCTAAAGCACTATCGTATTTATTGTAACGCAGTTCAAGC
TAATCAAATATGAGCAAGCCTATTTAAAAA

Genótipos: G>A

Primer F: 5' GGAGCTGCTGAGTGACATGA 3'

Primer R: 5' CCTTTATGGGAAAACCTTGC 3'

LRP5 N740N - ENSG00000162337 (exão10)

GTGCCTGTAATCCCCACCTACTTGGGAGGCTAAGGCTGGAGAATCGCTTGAACCCAGGGGGCAGAGGTTGCA
GTGAGCCGAGATCGCACCATTGCACTCCAGGCTGGGCAAGAAGAGCGAAACTCCGTCTCAAAAAAAAAAAAA
AAGATGCTGGTTCCTAAAATGTGGCCCTTTTCCTCTCACCTGCTGCCAGACCATCAGCCGCGCCTTCATGAAC
GGGAGCTCGGTGGAGCACGTGGTGGAGTTTGGCCTTGACTACCCGAGGGCATGGCCGTTGACTGGATGGG
CAAGAACCTCTACTGGGCCGACACTGGGACCAARAGAATCGAAGTGGCGCGGCTGGACGGGCAGTTCCGGC
AAGTCCTCGTGTGGAGGGACTTGGACAACCCGAGGTCGCTGGCCCTGGATCCCACCAAGGGGTAAGTGTTTG
CCTGTCCCGTGCGTCCTTGTTTACCTCGTATGAGACAGTGCGGGGGTGCCAACTGGGCAAGGTGGCAGGCT
GTCCGTGTGGCCCTCGGTGATTAGAGCTGTACTGACGTCATTAGCCTTGATGGTGGCCAGGACTGGTAGGGCC
CTCAGAGGTCATGGAGTTCCTTCGTGGAGCGGGTGCTGAGGCTGTATCAGGCACAGTGCTGGCTGCTTTCACC
TGGGCCGTCTACCGAAGTGTCCATGGAGCCTGCGTAGGGTGGGTATCTGTGTCGATTTTACAGATGCAGAAA
CAGGCTCAGAGAAACCGAGTGACTTCCCTAAGGTCACATACCCAGTTAGAGCAGAG

Genótipos: C>T

Primer F: 5' CTTTTCCTCCTCACCTGCTG 3'

Primer R: 5' CTTGTGTTACCTCGTATGAG 3'

LRP5 A1330V - ENSG00000162337 (exão 18)

CGCCATTGCCTGGGTTTTGCTGGGCGGGGCTGCGTGTGATGTTCTCCTCTGTCCCTCCCCAGAGCCGCCACC
TGCTCCCCGGACCAGTTTGCATGTGCCACAGGGGAGATCGACTGTATCCCCGGGGCCTGGCGCTGTGACGGC
TTCCCGAGTGCGATGACCAGAGCGACGAGGAGGGCTGCCCGTGTGCTCCGCCGCCAGTTCCCCTGCGCG
CGGGGTCAAGTGTGTGGACCTGCGCCTGCGCTGCGACGGCGAGGCAGACTGTCAGGACCGCTCAGACGAGGR
GGACTGTGACGGTGAGGCCCTCCCCGTCAAGGCTCTGCCAAGACCCTGGCCCTGCCCTCCGGGATACGAGCTT
GGGGCTGCCTCCGGCCTCACAGGAGTAGGGGCTCTGAAAACCTTTGCTTGCAAGGAGATTGCCAAGTCTGTCT
TTTAGGCCCAACAAGGAAAACTCTGCAGTTCCACCCATCCTGTCCACCAGGTAGTGTGGCTTGAAGGCAGACT
GTGAGGGTCTATCTCACCTTCTGCATTAGGTCAGGAGTTTCA

Genótipos: C>T

Primer F: 5' GACCAGAGCGACGAGGAG 3'

Primer R: 5' TCTGAAAACCTTTGCTTGCA 3'

Os fragmentos foram amplificados, pela reação em cadeia da polimerase, utilizando o *QIAGEN Multiplex PCR Kit* (http://www.protocol-online.org/forums/uploads/monthly_11_2009/post-13650-1257971950.ipb), de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação foi avaliada através da corrida dos produtos em gel de agarose a 2% corados com *GelRed*. Procedeu-se à purificação enzimática dos produtos amplificados pelo método *ExoSAP-it* (http://www.usbweb.com/assets/ExoSAP-IT_salestool_2009.pdf) e posteriormente realizou-se a reação de sequenciação pelo método de Sanger, utilizando o *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (http://mvz.berkeley.edu/egl/inserts/Big_Dye_v3.1_Protocol_Manual.pdf), de acordo com as instruções do fabricante. Os casos foram finalmente corridos no *Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer* e as sequências analisadas pelo *software Mutation Surveyor®*. Estes estudos genéticos foram efetuados no IPATIMUP sob a orientação do Prof. Doutor José

Carlos Machado. Dos 217 doentes com critérios de inclusão no estudo, somente 208 é que completaram o estudo genético do LRP5.

5. Avaliação radiográfica

As radiografias das mãos (com punhos e falanges) e dos pés foram obtidas com recurso a uma incidência pósterio-anterior e, em seguida, classificadas por um único leitor, treinado e experiente na avaliação do dano radiográfico em doentes com artrite reumatoide, cego para as variáveis clínicas do doente e para a sua alocação terapêutica no momento da avaliação dos raios-X. O índice de Sharp modificado por van der Heijde (300) foi o utilizado para determinar a extensão do dano estrutural radiográfico pela artrite reumatoide. Este índice permite pontuar objetivamente o grau de estreitamento da interlinha articular e as erosões ósseas nas radiografias das mãos e dos pés (300). Os estudos radiográficos foram realizados no Serviço de Radiologia do Centro Hospitalar de São João do Porto.

6. Avaliação da densidade mineral óssea

A DXA, a vulgar densitometria óssea, foi a técnica utilizada para medir a DMO no fémur proximal total esquerdo, na coluna lombar (L1-L4), na mão esquerda e na falange proximal do segundo dedo da mão esquerda. Estas determinações foram efetuadas com recurso a um aparelho LUNAR Expert XL[®] (GE Healthcare, EUA), no Serviço de Medicina Nuclear do Centro Hospitalar de São João do Porto. As diferentes medições foram obtidas de acordo com os procedimentos padronizados para cada uma das áreas anatómicas a avaliar. A região selecionada para a quantificação da DMO lombar foi a visão pósterio-anterior de L1 a L4 da coluna vertebral. Todas as vértebras lombares avaliáveis foram incluídas na medição e apenas foram excluídas as vértebras afetadas por mudanças estruturais locais ou por artefactos até um máximo de duas. A mão na sua totalidade (incluindo os ossos do carpo, mas excluindo as extremidades do rádio e do cúbito) foi incluída na análise e todas as medições foram efetuadas recorrendo ao software "Hand BMD" (GE Healthcare, EUA), que vem incluído nos *scanners* da GE Lunar[®] (GE Healthcare, EUA). Um mesmo técnico realizou todas as DXAs e os coeficientes de variação de medições repetidas variaram de 0,9 a 1,5% para a DMO nos diferentes locais anatómicos avaliados.

7. Avaliação cardiovascular

7.1. Cintigrafia de perfusão miocárdica

Todos os doentes submetidos a cintigrafia de perfusão miocárdica com sobrecarga farmacológica com adenosina assinaram um consentimento informado específico para este exame complementar de diagnóstico (189 doentes dos 217 elegíveis para o estudo).

As imagens *single photon emission–computed tomography* (SPECT) foram obtidas com recurso a uma Gama Câmara Infinia Hawkeye® (GE Healthcare, EUA), 15 a 30 minutos após a administração do radiofármaco, segundo um protocolo de um dia, em utilização de rotina no Serviço de Medicina Nuclear do Centro Hospitalar de São João, sob a coordenação do Dr. Jorge Gonçalves Pereira. As imagens SPECT foram obtidas após a injeção de tetrafosmina marcada com TC-99m nas doses de 10 mCi (na fase de sobrecarga) a 30 mCi (na fase em repouso). Este protocolo implicou uma perfusão de adenosina a um ritmo de 140 µg/Kg de peso/minuto durante 6 minutos e a administração do radiofármaco aos 3 minutos da perfusão de adenosina. As imagens em repouso só foram obtidas quando se verificou a presença de defeitos de perfusão na fase de sobrecarga, de forma a minimizar a exposição à radiação.

Numa base caso a caso e tendo em conta o predomínio do sexo feminino na nossa amostra, procedeu-se a correção de atenuação em função do IMC (≥ 30 Kg/m²) e do volume mamário, respetivamente, utilizando para o efeito um *scanner* de TC integrado no aparelho (301, 302). O procedimento consistiu num scan de TC de baixa dose (140 keV, 2.5 mAs) de 3 minutos de duração, no final das aquisições de imagem, quer na fase de sobrecarga, quer na fase de repouso.

A perfusão miocárdica foi avaliada de acordo com o modelo de divisão do ventrículo esquerdo em 17 segmentos. O software QGS/QPS® (CEDARS-SINAI, EUA) foi o utilizado para quantificar a extensão e a gravidade dos defeitos de perfusão, a motilidade e o espessamento das paredes, os volumes diastólico e sistólico finais e a fração de ejeção.

A perfusão miocárdica foi considerada anormal quando o *summed stress score* (SSS) foi ≥ 4 . Os defeitos de perfusão foram classificados como ligeiros ($SSS > 4$ e ≤ 8), moderados ($SSS > 8$ e ≤ 13) ou graves ($SSS > 13$) e a presença de isquemia miocárdica foi considerada significativa quando o *summed difference score* (SDS) foi ≥ 4 .

As imagens SPECT foram interpretadas consecutivamente e de forma cega, por dois experientes especialistas em Medicina Nuclear. As cintigrafias de perfusão miocárdica deste protocolo do estudo foram analisadas de forma intercalada e cega com as de outros doentes sem artrite reumatoide.

7.2. Score de cálcio coronário

Por razões de variada natureza, incluindo avarias de aparelho e dificuldades no agendamento da técnica, só foi possível realizar esta avaliação em 78 dos 217 doentes com artrite reumatoide elegíveis para o estudo. Os doentes foram avaliados em termos coronários com recurso a um *scanner* de TC de 64 cortes, Somatom Sensation Cardiac 64® (Siemens, Alemanha), com uma exposição total a radiação de 2,3 mSv. A presença de calcificação coronária foi avaliada pelo

software Argus® (Siemens, Alemanha) e o SCC foi calculado de acordo com o descrito por Agatston e colaboradores (303). Todos os exames foram interpretados e classificados por um único radiologista, o Dr. António Madureira, especialista em imagiologia cardiovascular do Serviço de Radiologia do Centro Hospitalar de São João do Porto, cego para o perfil clínico e terapêutico dos doentes. Estes últimos foram ainda estratificados em dois grupos de acordo com seu valor de $SCC \leq 10$ ou > 10 (303).

8. Metodologia estatística

A metodologia estatística específica de cada uma das análises de dados efetuadas encontra-se pormenorizadamente descrita na publicação respetiva. Todo este trabalho de análise estatística foi desenvolvido com a estreita e imprescindível colaboração da Prof. Doutora Raquel Lucas do Departamento de Epidemiologia Clínica, Medicina Preventiva e Saúde Pública da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

RESULTADOS

1. Características gerais da população incluída nos trabalhos publicados/submetidos para publicação

Na tabela 1 encontram-se resumidas as características gerais da amostra dos 208 doentes que completaram o estudo genético. As tabelas de distribuição das características gerais das amostras incluídas no estudo da cintigrafia miocárdica (n=189), no estudo do SCC (n=78) e no estudo da serotonina (n=205) estão patentes na publicação respetiva.

Tabela 1. Características antropométricas, clínicas e laboratoriais basais da nossa amostra de 208 doentes com artrite reumatoide estabelecida.

Características	Amostra total
Parâmetros relacionados com o doente	N= 208
Sexo feminino, n (%)	166 (79,8)
Mulheres pós-menopáusicas, n (%)	99 (59,6)
Tempo de menopausa, média (DP), anos	7,400 (8,434)
Sexo masculino, n (%)	42 (20,2)
Idade, média (DP), anos	53,520 (11,578)
IMC, média (DP), kg/m ²	26,948 (4,608)
<25	77 (37,0)
25≤IMC<30	86 (41,3)
≥30	45 (21,7)
História de tabagismo, n (%)	29 (13,9)
Hipertensão arterial, n (%)	62 (29,8)
Diabetes <i>mellitus</i> , n (%)	12 (5,8)
Dislipidemia, n (%)	46 (22,1)
Bloqueio de ramo esquerdo no eletrocardiograma, n (%)	5 (2,4)
Parâmetros relacionados com a doença	
Idade ao diagnóstico, média (DP), anos	39,770 (13,352)
Duração da doença, média (DP), anos	13,770 (10,083)
FR, média (DP), UI/mL	135,576 (246,641)
FR positivo (≥30 UI/mL), n (%)	125 (60,1)
ACPAs, média (DP), U/mL	519,666 (1199,020)
ACPAs positivos (>7 U/mL), n (%)	165 (79,3)
Manifestações extra-articulares, n (%)	68 (32,7)
DAS28 (4V), média (DP)	4,249 (1,329)
DAS28 (3V), média (DP)	4,080 (1,292)
DAS28 (4v; PCR), média (DP)	3,721 (1,271)
DAS28 (3v; PCR), média (DP)	3,504 (1,249)
Atividade da doença pelo DAS28 (4V)	
Baixa (DAS28(4v) ≤3,2)	52 (25,0)
Moderada (3,2< DAS28(4V) ≤5,1)	103 (49,5)
Elevada (DAS28(4v)>5,1)	53 (25,5)
NAD (em 68), média (DP)	11,582 (12,120)
NAT (em 66), média (DP)	4,664 (5,238)
VS, média (DP), mm (primeira hora)	26,990 (20,090)
PCR, média (DP), mg/L	11,582 (12,120)
Score de HAQ, média (DP)	1,254 (0,709)
HAQ ≤0,5, n (%)	43 (20,7)
Score de erosões, média (DP)	62,113 (50,088)

Score de estreitamento da interlinha articular, média (DP)	81,774 (31,913)
SHS total, média (DP)	143,892 (76,739)
Parâmetros relacionados com a DXA	
DMO do fêmur proximal total esquerdo, média (DP), g/cm ²	0,931 (0,149)
DMO da coluna lombar, média (DP), g/cm ²	1,074 (0,173)
DMO da mão esquerda, média (DP), g/cm ²	0,385 (0,069)
Classificação da OMS	
Normal, n (%)	105 (50,4)
Osteopenia, n (%)	70 (33,7)
Osteoporose, n (%)	33 (15,9)
Parâmetros relacionados com a terapêutica da doença	
Terapêutica sintomática	
Corticosteroides, n (%)	171 (82,2)
Dose diária em equivalentes de prednisolona, média (DP), mg	5,203 (3,950)
Tempo sobre corticosteroides, média (DP), anos	11,519 (9,041)
AINEs, n (%)	159 (76,4)
csDMARDs	174 (83,7)
Exclusivamente, n (%)	101 (48,6)
Cumulativos, média (DP)	2,500 (1,390)
Tempo sobre csDMARDs, média (DP), meses	99,773 (85,133)
Metotrexato, n (%)	141 (67,8)
Leflunomida, n (%)	44 (21,2)
Hidroxicloroquina, n (%)	13 (6,3)
Sulfassalazina, n (%)	13 (6,3)
Ciclosporina, n (%)	3 (1,4)
Azatioprina, n (%)	2 (1,0)
boDMARDs, n (%)	107 (51,4)
Monoterapia, n (%)	32 (29,9)
Tempo sob agentes biotecnológicos, média (DP), meses	32,527 (37,402)
Inibidores do TNF α , n (%)	87 (41,8)
Adalimumab, n (%)	29 (13,9)
Etanercept, n (%)	42 (20,2)
Infliximab, n (%)	16 (7,7)
Rituximab, n (%)	13 (6,3)
Anacinra, n (%)	3 (1,4)
Tocilizumab, n (%)	4 (1,9)
Bisfosfonatos, n (%)	69 (33,2)
Tempo sob bisfosfonatos, média (DP), meses	18,625 (31,967)
Suplementação em Vitamin D, n (%)	43 (20,7)
Suplementação em ácido fólico, n (%)	108 (51,9)
Inibidores da bomba de prótons, n (%)	147 (70,7)
ISRSSs, n (%)	13 (6,3)
Parâmetros relacionados com terapêuticas cardiovasculares	
Antiagregantes, n (%)	22 (10,6)
IECAs, n (%)	29 (13,9)
ARAs, n (%)	26 (12,5)
ACCs, n (%)	20 (9,6)
BBs, n (%)	16 (7,7)
Diuréticos, n (%)	40 (19,2)
Varfarina, n (%)	4 (1,9)
Estatinas, n (%)	45 (21,6)
Antidiabéticos orais, n (%)	18 (8,7)
Insulina, n (%)	4 (1,9)
Biomarcadores séricos	

Homocisteína, média (DP), µmol/L >12,44	10,664 (3,619) 44 (21,2)
Ácido fólico, média (DP), ng/mL <2,2	9,153 (4,571) 1 (0,5)
Creatinina, média (DP), mg/L >10	8,811 (2,292) 38 (18,3)
Cálcio total, média (DP), mEq/L	4,704 (0,187)
Fósforo, média (DP), mg/L	31,790 (5,767)
Fosfatase alcalina, média (DP), U/L	72,635 (24,258)
25(OH) vitaminD3, média (DP), ng/mL <15 15≤25(OH) vitaminD3<30 ≥30	25,583 (12,482) 27 (13,0) 109 (52,4) 72 (34,6)
β-CTX, média (DP), ng/mL	0,286 (0,187)
Osteocalcina, média (DP), ng/mL	16,839 (7,967)
PTH-I, média (DP), pg/mL >65	43,145 (19,645) 24 (11,5)
DKK-1, média (DP), pmol/L	99,469 (59,037)
Esclerostina, média (DP), ng/mL	0,243 (0,098)
OPG, média (DP), pmol/L	3,886 (1,950)
RANKL, média (DP), pmol/L	3800,146 (2059,584)
Razão OPG/RANKL, média (DP)	0,00154 (0,00183)
Serotonina, média (DP), ng/mL	179,268 (108,497)

ACPAs, *anti-citrullinated protein antibodies*; AINEs, anti-inflamatórios não-esteróides; ACCs, antagonistas dos canais de cálcio; ARAs, antagonistas do receptor da angiotensina II; BBs, bloqueadores beta; β-CTX, *beta-carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen*; boDMARDs, *biological original synthetic disease-modifying antirheumatic drugs*; csDMARDs, *conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drugs*; DAS, *disease activity score*; DKK-1, *dickkopf-1*; DP, desvio padrão; DMO, densidade mineral óssea; DXA, absorciometria por duplo feixe de raios-X (densitometria óssea); FR, factor reumatoide; HAQ, *Health Assessment Questionnaire*; IMC, índice de massa corporal; IECAs, inibidores da enzima de conversão da angiotensina II; ISRSs, inibidores selectivos da recaptção da serotonina; NAD, número de articulações dolorosas; NAT, número de articulações tumefactas; OMS, Organização Mundial de Saúde; OPG, osteoprotegerina; PCR, proteína C reactiva; PTH-I, paratormona intacta; RANKL, *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*; SHS, score de Sharp modificado por van der Heijde; TNF α , factor de necrose tumoral alfa; VS, velocidade de sedimentação.

2. Relativamente ao dano cardiovascular na artrite reumatoide

2.1. Myocardial perfusion in rheumatoid arthritis patients: associations with traditional risk factors and novel biomarkers

M Bernardes, TS Vieira, MJ Martins, R Lucas, L Costa, JG Pereira, F Ventura, E Martins. Myocardial perfusion in rheumatoid arthritis patients: associations with traditional risk factors and novel biomarkers. *Biomed Res Int* 2017; 2017:6509754. doi: 10.1155/2017/6509754.

Research Article

Myocardial Perfusion in Rheumatoid Arthritis Patients: Associations with Traditional Risk Factors and Novel Biomarkers

Miguel Bernardes,^{1,2} Tiago S. Vieira,³ Maria João Martins,^{4,5} Raquel Lucas,^{6,7} Lúcia Costa,¹ Jorge G. Pereira,³ Francisco Ventura,⁸ and Elisabete Martins^{2,4,9}

¹Department of Rheumatology, São João Hospital Center, Porto, Portugal

²Department of Medicine, Faculty of Medicine, University of Porto, Alameda Prof. Hernâni Monteiro, 4200-319 Porto, Portugal

³Department of Nuclear Medicine, São João Hospital Center, Porto, Portugal

⁴3s-Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto, Porto, Portugal

⁵Department of Biomedicine, Unit of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Porto, Porto, Portugal

⁶Department of Clinical Epidemiology, Predictive Medicine and Public Health, Faculty of Medicine, University of Porto, Porto, Portugal

⁷EPI Unit-Institute of Public Health, University of Porto, Porto, Portugal

⁸Faculty of Medicine, University of Porto, Porto, Portugal

⁹Department of Cardiology, São João Hospital Center, Porto, Portugal

Correspondence should be addressed to Miguel Bernardes; mbernardes09@gmail.com

Received 26 December 2016; Accepted 2 April 2017; Published 3 May 2017

Academic Editor: Lorenzo Cavagna

Copyright © 2017 Miguel Bernardes et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction. Cardiovascular (CV) diseases are a major cause of death in rheumatoid arthritis (RA) patients. Novel biomarkers [B-type natriuretic peptide (BNP); osteoprotegerin (OPG)/receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) ratio; and dickkopf-1 (DKK-1)] have been used in CV risk assessment. We analysed, in established RA patients, the presence of silent myocardial ischemia and its association with clinical variables, BNP, and bone and atheroma biomarkers. **Methods.** From a single-center tertiary referral hospital, RA patients asymptomatic for CV disease were submitted to myocardial perfusion scintigraphy (MPS) under adenosine stress and biomarkers measurements. Logistic regression was used to estimate crude odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI). **Results.** In 189 patients, perfusion defects were frequent (25%) and associated with BNP ≥ 100 pg/mL (OR = 5.68; 95% CI: 2.038–15.830), fourth log OPG/RANKL ratio quartile (OR = 2.88; 95% CI: 1.091–7.622), and DKK-1 ≥ 133 pmol/L (OR = 2.69; 95% CI: 1.058–6.840). Similar associations were confirmed in those with C-reactive protein $>$ or ≤ 3 mg/L. No relationship was found with the majority of traditional CV factors nor with disease variables. **Conclusions.** Our results corroborated the hypothesis that MPS could reveal subclinical CV dysfunction, supported the utility of BNP measurements as a screening tool, and put in perspective the potential usefulness of complementary approaches in CV risk assessment in RA patients.

1. Introduction

Cardiovascular diseases (CVD) are a major cause of death in rheumatoid arthritis (RA) patients [1] and clinical events occur approximately 10 years earlier than in the general population [2]. The pooled relative risk of CVD is near 1.5 [3]

and cardiac risk is similar to that of type 2 diabetes mellitus (T2DM), especially in RA patients with long disease duration [4].

The CV risk increases in ongoing disease but is already higher than in non-RA subjects at the time of RA diagnosis [5]. The risk seems to be less associated with the traditional

(arterial hypertension, diabetes, dyslipidemia, and obesity) or other known CV risk factors (hyperuricemia, hyperhomocysteinemia, and vitamin D deficiency) and more with the disease itself (inflammatory and autoimmune mechanisms) and therapeutic related variables [6]. The relationships with and between each risk factor are complex and have been progressively unraveled in recent years [6].

Considering the increased risk, the European League Against Rheumatism (EULAR) recommends annual CV risk assessment in RA patients (or every 2 to 3 years, if low CV risk and inactive disease occur) [7], with calculation of a modified SCORE index based on traditional CV risk factors, multiplied by 1.5 in the presence of 2 out of 3 RA factors: disease duration > 10 years, certain extra-articular manifestations, or positivity for rheumatoid factor (RF) or anti-cyclic citrullinated peptides (anti-CCP) antibodies.

However, there are uncertainties about the effectiveness of this method in individual CV risk appraisal [5]. In line, several authors have pointed out the need for complementary approaches, including CV imaging techniques and the quantification of newly available biomarkers [8–10].

Myocardial perfusion scintigraphy (MPS) is an imaging method robustly validated in CV risk assessment in several categories of patients [11].

On the other hand, in recent years, new biomarkers that can reflect the interplay between inflammation, atherosclerosis, and plaque instability phenomena have been tested on clinical grounds and some seem promising in CV risk estimation. Serum B-type natriuretic peptides have been clearly associated with CV death and, in RA patients, with CV and general mortality [9]. Less data and conflicting results still exist in what regards the association between another group of mediators, such as osteoprotegerin (OPG) [10], the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) [12], or dickkopf-1 (DKK-1) [13], and the development of CVD in RA.

In this study we included MPS in our risk stratification protocol of patients with established RA. We aimed to evaluate the prevalence of myocardial perfusion defects and to relate the MPS results with various clinical features, including disease characteristics, therapy, traditional CV risk factors, and serum biomarkers [B-type natriuretic peptide (BNP), OPG, RANKL, DKK-1, and sclerostin].

2. Patients and Methods

2.1. Rheumatoid Arthritis Patients. During a six-month period, patients with RA, classified according to the 1987 American College of Rheumatology criteria [14] and asymptomatic for cardiac disease (angina or heart failure signs and symptoms), were prospectively included in the study protocol. In this time-frame, a total of 216 RA patients were eligible, although only 189 accepted to perform MPS.

The exclusion criteria were history of previous ischemic heart disease, presence of angina, heart failure, or Q waves on basal electrocardiogram (ECG).

Through a rheumatology appointment, all subjects underwent clinical assessment using the Portuguese version

of the Stanford Health Assessment Questionnaire (HAQ) and the Disease Activity Score (DAS28) four variables (4v) [15], the most commonly used tools in daily clinical practice to determine the RA disease activity. All data regarding past and ongoing prescribed medications, including NSAIDs and corticosteroids exposure time, were obtained from medical records review. Corticosteroids daily dose was the one at the study inclusion time.

Hypertension, diabetes, and dyslipidemia were defined by self-reporting and contemporary use of compatible medications and/or clinical data assessment in previous medical registries. Office blood pressure (>140/90 mmHg), lipid profile (total cholesterol > 200 mg/dL), and fasting plasma glucose (<126 mg/dL) were categorized according to the European guidelines. The smoking status (past and current) was registered and the body mass index (BMI) calculated.

2.2. Laboratory Measurements. Between 08:00 and 10:00 hours in the morning, a fasting blood sample was collected to evaluate the lipid profile [high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, total cholesterol (TC), triglycerides, lipoprotein (a), apolipoprotein A1 (ApoA1), and apolipoprotein B (ApoB)], as well as glucose and insulin, C-reactive protein (CRP), erythrocyte sedimentation rate (ESR), RF and anti-CCP antibodies, homocysteine, uric acid, 25(OH) vitamin D3, parathyroid hormone, osteocalcin, BNP, OPG, RANKL, DKK-1, and sclerostin levels. Serum samples were stored at -70°C for OPG, RANKL, DKK-1, and sclerostin measurements by ELISA. All these specimens were measured in duplicate, according to the manufacturer's instructions and then averaged. OPG and DKK-1 were determined using kits from BIOMEDICA immunoassays (Vienna, Austria); the intra-assay coefficients of variation (aCV) were $\leq 3\%$ for both; the inter-aCV was $\leq 3\%$ for DKK-1 and between 3 and 5% for OPG. RANKL was determined using a kit from CUSABIO (Wuhan, China); the intra-aCV was $< 8\%$ and the inter-aCV was $< 10\%$. Sclerostin was determined using a kit from TECO (Sissach, Switzerland); the intra- and inter-aCVs were 3.8–8.0% and 3.3–9.0%, respectively.

2.3. Myocardial Perfusion Scintigraphy. For minimization of exposure to radiation, all patients underwent a routine procedure used in our institution of adenosine-stress single photon emission-computed tomography (SPECT) myocardial perfusion imaging, in a one-day protocol, with the use of stress-first imaging protocol. Images at rest were only acquired if any perfusion defects were detected after the stress phase. This protocol implies the injection of 10 (at stress) to 30 (at rest) mCi doses of TC-99m tetrofosmin, adenosine infused at a rate of 140 $\mu\text{g/kg/min}$ over 6 min, and radiopharmaceutical administration at 3 min of adenosine perfusion.

SPECT imaging was acquired in a Gamma Camera Infinia Hawkeye, GE Healthcare, 15–30 min after radiopharmaceutical administration.

The SPECT images were interpreted in a blinded fashion, by two experienced physicians, consecutively during the

study protocol, interspersed with other MPS in patients without RA. Bearing in mind the female predominance [16, 17] attenuation correction (AC) was applied on a case by case basis, depending on patient BMI ($\geq 30 \text{ kg/m}^2$) and breast volume, using an integrated computed tomography (CT) scanner. A 3 min low-dose CT scan (140 keV, 2.5 mAs) was acquired at the end of stress and rest acquisitions.

Myocardial perfusion was assessed through expert visual analysis in a 17 left ventricle (LV) segmentation model. QGS/QPS[®] software was used to quantify the extension and severity of perfusion defects, wall motion and wall thickening scores, LV end-diastolic and end-systolic volumes (EDV and ESV), and ejection fraction (EF).

Myocardial perfusion was considered abnormal only if the summed stress score (SSS) was ≥ 4 . Perfusion defects were classified as mild (SSS ≥ 4 and ≤ 8), moderate (SSS > 8 and ≤ 13), or severe (SSS > 13) and myocardial ischemia was considered significant if the summed difference score (SDS) with respect to MPS at rest was ≥ 4 [18].

2.4. Ethics. Informed consent was obtained from each patient. The study protocol conforms to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki as reflected in a priori approval (on March 13, 2008) by the institution's human research committee.

2.5. Follow-Up Data. All patients were followed during a five-year period. Death and CV events, including the onset of cardiac symptoms, were registered.

2.6. Statistical Analyses. Qualitative data are described as absolute counts and proportions and quantitative data as mean (standard deviation). CRP, ESR, and OPG/RANKL ratio were log-transformed to obtain symmetrical distributions. The magnitude of the associations between clinical and laboratory variables and the presence of defects in MPS were assessed using logistic regression models in order to estimate crude odds ratios (OR) and their 95% confidence intervals (CI). All analyses were two-sided and p values < 0.05 were considered statistically significant. Since this study was oriented by a priori defined hypotheses no adjustments for multiple comparisons were conducted, as supported by previous literature [19]. Statistical analyses were performed using STATA software V.II (Statacorp, College Station, Texas, USA).

3. Results

3.1. Patients Characteristics. One hundred and eighty-nine patients with RA were included, with a mean age of 53 ± 12 years, the majority ($n = 153$, 81%) females. Disease duration, measured from the date of diagnosis, was 14 ± 10 years. The majority of patients presented erosive disease ($n = 187$, 99%) and were seropositive for RF ($n = 115$, 61%) and anti-CCP ($n = 152$, 80%) antibodies. The mean DAS28 (4v) and HAQ were 4.266 ± 1.324 and 1.275 ± 0.708 , respectively. DAS28 remission was present in 18 (10%) patients. Extra-articular manifestations were present in 67

(35.4%) patients: Sjögren syndrome (20%), rheumatoid nodes (16%), interstitial lung disease (3%), AA amyloidosis (3%), scleritis (3%), and rheumatoid vasculitis (2%).

Clinical and laboratory variables are shown in Table 1.

3.2. Relation of Myocardial Perfusion Scintigraphy Findings with Clinical and Laboratory Parameters. On basal ECG, 184 (97%) patients were in sinus rhythm and 5 (3%) had left bundle branch blockage (LBBB).

MPS showed myocardial perfusion defects (SSS ≥ 4) in 47 (25%) patients, mild defects in 35 (18.5%), moderate in 10 (5.3%), and severe in 2 (1%). The defects had a mean SDS of 4.1 ± 3 and stress extension of $2.5 \pm 3.6\%$ and were reversible at rest in 31 (16%) cases. LV ejection fraction (LVEF) was inferior to 45% in 9 (4.76%) patients with a mean value of $63.7 \pm 9.8\%$.

The perfusion defects were either unique (25/47, 53%) or multiple (22/47, 47%), with no preferential distribution at different coronary territories.

Figure 1 illustrates an abnormal MPS in female RA patient without any cardiac symptom.

On logistic regression analysis, no relationship was found between the presence of myocardial perfusion defects and patient age, gender, RA disease or therapy related features, smoking habits, history of dyslipidemia, diabetes, or hypertension, neither with determinations, at inclusion protocol, of serum levels of lipids, glucose, or insulin. MPS findings were associated with BMI (OR = 1.120; $p = 0.002$), therapy with ARAs (OR = 2.471; $p = 0.046$), diuretics (OR = 2.195; $p = 0.045$), and oral antidiabetic (OR = 3.031; $p = 0.033$), as well as with circulating levels of BNP $\geq 100 \text{ pg/mL}$ (OR = 5.680; $p = 0.001$), DKK-1 $\geq 133 \text{ pmol/L}$ (OR = 2.690; $p = 0.038$), and fourth log OPG/RANKL ratio quartile (OR = 2.884; $p = 0.033$) (Table 2).

In a subgroup analysis of those who presented CRP higher than 3 mg/L (upper limit of normality for our laboratory), we found the same associations with similar magnitudes, except for ARAs and diuretics use. MPS findings were associated with BMI (OR = 1.174; $p = 0.001$), oral antidiabetics (OR = 3.840; $p = 0.017$), levels of BNP $\geq 100 \text{ pg/mL}$ (OR = 5.610; $p = 0.004$), DKK-1 $\geq 133 \text{ pmol/L}$ (OR = 3.142; $p = 0.056$), and fourth log OPG/RANKL ratio quartile (OR = 2.410; $p = 0.001$).

3.3. Follow-Up Data: Cardiovascular Events. During a period of 5 years, 9 patients deceased, 2 from CV causes: two sudden cardiac deaths, one of them after an acute myocardial infarction (MI) (confirmed by autopsy). In these two male patients, LVEF was inferior to 45% and both presented perfusion defects on MPS.

Apart from the CV deaths, three other patients developed CV events. A male patient, with LBBB without perfusion defects and with normal LVEF, had MI four years after MPS evaluation. A female patient, with a mild perfusion defect and normal LVEF, developed angina and was submitted to percutaneous stent implantation in the anterior descending coronary artery. Another female patient, without perfusion defects and with normal LVEF, had a stroke four years after MPS evaluation. All these 5 patients with CV events were

TABLE 1: Clinical and laboratory variables of the rheumatoid arthritis sample enrolled in the study.

Characteristic	Value
<i>Patient related</i>	
Female, <i>n</i> (%)	153 (81.0)
Postmenopausal, <i>n</i> (%)	59 (31.2)
Time since menopause, mean (SD), years	7.330 (8.275)
Age, mean (SD), years	53.340 (11.502)
BMI, mean (SD), kg/m ²	27.150 (4.768)
Ever smokers, <i>n</i> (%)	24 (12.7)
Hypertension, <i>n</i> (%)	39 (20.6)
Diabetes mellitus, <i>n</i> (%)	14 (7.4)
Dyslipidemia, <i>n</i> (%)	23 (12.2)
<i>Disease related</i>	
Disease duration, mean (SD), years	13.72 (9.955)
RF positivity, <i>n</i> (%)	115 (60.847)
Anti-CCP antibodies positivity, <i>n</i> (%)	152 (80.423)
DAS28 (4V), mean (SD)	4.266 (1.324)
Remission (DAS28 (4v) < 2.6)	18 (9.5)
Low (2.6 < DAS28 (4v) ≤ 3.2)	27 (14.3)
Moderate (3.2 < DAS28 (4V) ≤ 5.1)	95 (50.3)
High (DAS28 (4v) > 5.1)	49 (25.9)
ESR, mean (SD), mm (first hour)	27.100 (20.603)
CRP, mean (SD), mg/L	11.573 (20.045)
Global health on VAS, mean (SD)	44.190 (17.794)
HAQ score, mean (SD)	1.275 (0.708)
<i>RA related treatment</i>	
Corticosteroids, <i>n</i> (%)	155 (82.0)
Daily dose in prednisolone equivalents, mean (SD), mg	5.139 (3.977)
Time under corticosteroids, mean (SD), years	11.429 (8.981)
NSAIDs, <i>n</i> (%)	142 (75.1)
DMARDs, <i>n</i> (%)	160 (84.7)
Cumulative, mean (SD)	2.534 (1.416)
Time under DMARDs, mean (SD), months	104.037 (87.714)
Methotrexate, <i>n</i> (%)	130 (68.8)
Leflunomide, <i>n</i> (%)	40 (21.1)
Biologic DMARDs, <i>n</i> (%)	97 (51.3)
Time under biologics, mean (SD), months	60.258 (30.080)
Anti-TNF α blockers, <i>n</i> (%)	83 (43.9)
Non-anti-TNF α blockers, <i>n</i> (%)	14 (7.4)
Bisphosphonates, <i>n</i> (%)	69 (36.5)
<i>Cardiovascular related treatment</i>	
Antiaggregants, <i>n</i> (%)	22 (11.6)
ACEIs, <i>n</i> (%)	24 (12.7)
ARAs, <i>n</i> (%)	24 (12.7)
CCAs, <i>n</i> (%)	18 (9.5)
BBs, <i>n</i> (%)	15 (7.9)
Diuretics, <i>n</i> (%)	37 (19.6)
Warfarin, <i>n</i> (%)	5 (2.6)
Statins, <i>n</i> (%)	45 (23.8)
Oral antidiabetic agents, <i>n</i> (%)	17 (9.0)
Insulin, <i>n</i> (%)	5 (2.6)

ACEIs, angiotensin convert enzyme inhibitors; ARAs, angiotensin receptor antagonists; BBs, beta-blockers; BMI, body mass index; CCAs, calcium channel antagonists; CCP, cyclic citrullinated peptides; CRP, c-reactive protein; DAS, disease activity score; DMARDs, disease-modifying antirheumatic drugs; ESR, erythrocyte sedimentation rate; HAQ, health assessment questionnaire; NSAIDs, nonsteroidal anti-inflammatory drugs; RF, rheumatoid factor; SD, standard deviation; TNF α , tumour necrosis factor alpha; VAS, visual analogic scale.

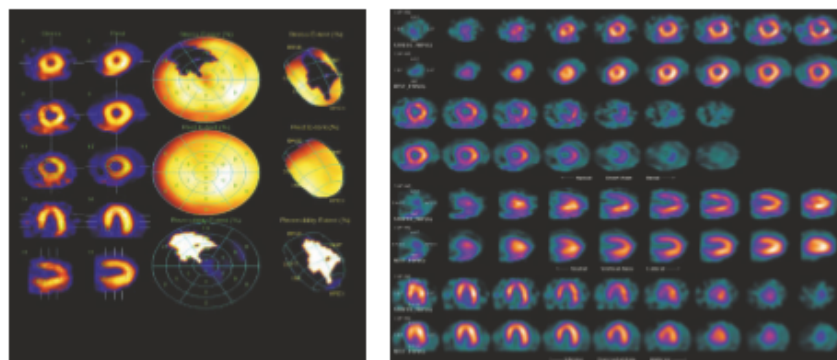


FIGURE 1: Moderate and reversible anteroseptal perfusion defect compatible with ischemia in the left anterior descending coronary artery territory in an asymptomatic female RA patient.

seropositive for RF and anti-CCP antibodies, were nonobese, and had low to moderate disease activity by DAS28 and a normal BNP value at baseline and at least one traditional CV risk factor under treatment.

4. Discussion

The major finding of this study comprised the description of myocardial perfusion scintigraphy findings in a large RA patient sample, characterized by a long disease duration, with moderate activity, and with no apparent cardiac symptoms. The relationship of MPS results with several clinical variables, including traditional CV risk factors and novel biomarkers of atherosclerosis, was also evaluated.

RA is characterized by earlier atherosclerosis and CV events in comparison with the general population [2, 20]. Overall, the pooled relative risk is 1.68 and 1.87 for myocardial infarction and congestive heart failure (HF), respectively [3]. Myocardial ischemia is often asymptomatic and clinical detection is frequently made at an advanced stage. HF is a major cause of morbidity and mortality in RA, accounting for about 20% of mortality in patients with RA [21]. The risk of HF has been associated with RF positivity, ESR, severe extra-articular involvement, and steroids use [22].

As most CV events are of cardiac origin, it seems appropriate to consider the integration of cardiac imaging in primary prevention strategies, at least in the highest risk patients. However we have few clinical tools able to a priori identify these patients and, until now, few studies have assessed the presence of silent ischemia in large RA patients populations [23].

MPS is a robustly validated risk stratification method in different populations, and a normal MPS is associated with $\leq 1\%$ /year combined mortality and nonfatal infarction rate [24]. It is a noninvasive functional test that depends not only on the presence of epicardial coronary stenosis (macrovascular disease) but also on the endothelial function, including in the small vessels territories (microvascular disease), which

may be early affected during disease development and can be modulated by the inflammatory state.

It is important to note that the nature of the perfusion defects can have an ischemic/atherosclerotic etiology but could also result from other causes like cardiac amyloidosis [8] or interstitial fibrosis. The clinical impact of discriminating the different causes of perfusion defects, for instance, by cardiac magnetic resonance is still unknown.

No relationship was found between the MPS results and the classic CV risk factors. The lack of associations could be explained by the well-known complex interplay between inflammation and therapy that could alter the link between risk factors and atherosclerosis manifestations, as already pointed by other authors [25].

The fact that in our patients we did not find relations between MPS results and the *traditional* risk factors can thus be explained by the fact that the usual relationships were changed by the inflammatory RA disease activity and/or by medications such as with nonbiologic (85%) or biological (51%) DMARDs.

ESR and CRP levels are related to disease activity and inflammation; seropositivity also increases CV risk in RA patients [26]. On the other hand, high CRP levels are related to an increased intima media thickness [27] and baseline values also predict accelerated brachial arterial wall changes in patients with recent-onset RA [28].

In our study, the presence of perfusion defects on MPS was not related to systemic inflammatory markers (CRP and ESR), nor with the presence of RF and anti-CCP antibodies or DAS28 score.

The inflammatory state could have changed over time, especially under therapy, and, later in disease progression, it could be difficult to relate a unique plasma level (mean CRP value of 11.57 ± 20.0 mg/L in our patients) with the extension of a long lasting process of cardiac damage.

B-type natriuretic peptides (BNP and NT-proBNP) are independent predictors of CV morbidity and of all causes of mortality including in RA patients.

TABLE 2: Crude odds ratios for the associations between rheumatoid arthritis patients' characteristics and the presence of myocardial perfusion defects obtained by logistic regression analysis.

	OR	95% CI for OR		<i>p</i> value
		Lower	Upper	
Male sex (versus female)	1.009	0.436	2.334	0.984
Age (per year)	1.000	0.971	1.029	0.989
Disease duration (per year)	1.013	0.981	1.047	0.435
BMI (per kg/m ²)	1.120	1.044	1.202	0.002
Ever smoker (versus never smoker)	1.008	0.375	2.711	0.987
Smoking exposure (per year)	1.002	0.918	1.093	0.971
Time under biologics	1.002	0.993	1.010	0.729
DAS28 (4v) (per unit)	0.913	0.710	1.176	0.482
HAQ (per unit)	0.930	0.582	1.485	0.760
log CRP (per unit)	1.129	0.872	1.464	0.357
log ESR (per unit)	0.896	0.562	1.428	0.644
BNP (pg/mL)				
<30	Reference	Reference	Reference	Reference
≥30 and <100	1.635	0.780	3.428	0.193
≥100	5.680	2.038	15.830	0.001
Insulin resistance				
<1	Reference	Reference	Reference	Reference
≥1 and <1.5	2.260	0.816	6.263	0.117
≥1.5 and <2.5	1.361	0.500	3.707	0.546
≥2.5	1.005	0.322	3.135	0.994
TC/HDL ratio (per unit)	0.987	0.704	1.386	0.941
LDL/HDL ratio (per unit)	0.980	0.643	1.495	0.927
ApoB/ApoA1 ratio (per unit)	0.400	0.066	2.424	0.319
TC (per mg/dL)	0.935	0.368	2.377	0.888
LDL (per mg/dL)	0.952	0.295	3.070	0.934
HDL (per mg/dL)	1.005	0.103	9.801	0.996
TGs (per mg/dL)	1.338	0.774	2.314	0.297
ApoA1 (per mg/dL)	1.004	0.992	1.016	0.508
ApoB (per mg/dL)	0.995	0.980	1.010	0.526
Lp(a) (mg/dL) (per unit)	0.985	0.969	1.002	0.076
Uric acid (per mg/L)	1.010	0.989	1.032	0.359
Homocysteine (per μmol/L)	1.013	0.931	1.103	0.757
25(OH) vitamin D3 (per ng/mL)	1.023	0.998	1.048	0.077
Osteocalcin (per ng/mL)	1.010	0.968	1.054	0.651
DKK-1 (pmol/L) (per unit)	1.010	1.002	1.017	0.010
<60	Reference	Reference	Reference	Reference
≥60 and <90	0.778	0.263	2.297	0.649
≥90 and <133	1.657	0.630	4.355	0.306
≥133	2.690	1.058	6.840	0.038
Sclerostin (per ng/mL)	2.071	0.063	68.436	0.683
log OPG/RANKL (per unit)	1.667	1.106	2.513	0.015
First quartile	Reference	Reference	Reference	Reference
Second quartile	1.357	0.481	3.828	0.564
Third quartile	1.537	0.553	4.268	0.410
Fourth quartile	2.884	1.091	7.622	0.033
Osteoprotegerin (per pmol/L)	1.161	0.987	1.366	0.072
RANKL (per pmol/L)	0.999	0.999	1.000	0.111
Prednisolone (mg a day) (per unit)	1.066	0.984	1.154	0.119

TABLE 2: Continued.

	OR	95% CI for OR		p value
		Lower	Upper	
Corticosteroid therapy duration (years) (per unit)	1.010	0.974	1.047	0.588
Methotrexate (mg once a week) (per unit)	0.992	0.952	1.034	0.713
NSAIDs use (current versus not current)	0.823	0.391	1.737	0.610
Bisphosphonates use (ever versus never)	0.671	0.330	1.365	0.271
ACEIs use (current versus not current)	1.615	0.643	4.060	0.308
ARAs use (current versus not current)	2.471	1.015	6.018	0.046
CCAs use (current versus not current)	1.585	0.560	4.490	0.386
BBs use (current versus not current)	1.108	0.335	3.660	0.867
Diuretics use (current versus not current)	2.195	1.018	4.732	0.045
Antidyslipidemic therapy (current versus not current)	0.934	0.430	2.029	0.863
Insulin therapy (current versus not current)	2.059	0.333	12.715	0.437
Oral antidiabetic therapy (current versus not current)	3.031	1.096	8.382	0.033
Diabetes mellitus	1.759	0.559	5.539	0.334
Arterial hypertension	1.460	0.671	3.180	0.340

ACEIs, angiotensin converter enzyme inhibitors; Apo, apolipoprotein; ARAs, angiotensin receptor antagonists; BBs, beta-blockers; BMI, body mass index; BNP, brain natriuretic peptide; CCAs, calcium channel antagonists; CI, confidence interval; CRP, c-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; DAS, disease activity score; DKK-1, dickkopf-1; HAQ, health assessment questionnaire; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; Lp(a), lipoprotein (a); NSAIDs, nonsteroidal anti-inflammatory drugs; OPG, osteoprotegerin; OR, odds ratio; RANKL, receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand; TC, total cholesterol; TGs, triglycerides.

In early inflammatory polyarthritis, NT-proBNP has been associated with HAQ score and CRP [29] and this fact may be indicative of the link between joint and cardiac (myocardial and/or vascular) structural damage induced by chronic inflammatory diseases.

In our RA patients, with a longer disease duration, BNP was poorly correlated with HAQ (Spearman correlation; $r = 0.189$, $p = 0.007$), but levels superior to 100 pg/mL were strongly associated with the presence of perfusion defects on MPS independently of LV EF.

This result corroborates the hypothesis that MPS could reveal subclinical cardiac dysfunction and supports the utility of BNP measurement as a screening tool in the assessment of CV risk in RA patients. This hypothesis needs to be corroborated with further studies.

OPG and RANKL are bone-controlling cytokines of mineral metabolism but also participate in the process of atherogenesis, calcification, and plaque rupture at the vascular walls [30].

In vascular atherogenic remodeling process, OPG could be increased due to a secondary compensatory mechanism activation [31], and higher OPG serum levels have been associated with coronary atherosclerosis [32], silent myocardial ischemia, increased CV mortality [33], myocardial infarction, and heart failure prognosis [34].

By contrast, RANKL promotes calcification at the vascular wall and it has been mostly linked with the risk of plaque instability and rupture [35].

In our study, we did not find associations between myocardial perfusion defects with either RANKL or OPG isolated levels, but rather with the highest quartile of the distribution of the OPG/RANKL ratio. This elevated ratio

may be due to the presence of an ongoing vascular atherosclerosis (high OPG) in a still stable and low-risk plaques (low RANKL) in patients with abnormal MPS.

DKK-1 and sclerostin, two Wnt pathway inhibitors, are also involved in the atherosclerosis process. DKK-1 is linked not only with the effects of TNF α on joints in RA [36] but also with platelet-mediated endothelial cell activation [13], endothelial dysfunction in T2DM [37], vascular calcification [38], and premature myocardial infarction [39]. DKK-1 serum concentration has already been correlated with the presence of coronary artery calcification and atherosclerosis [40], and its measurement has been proposed as a simple test that might be useful in CV risk stratification. Our results corroborate this last hypothesis since we found a significant association of DKK-1 levels with the presence of myocardial perfusion defects.

The occurrence of few number of CV events in our patients precludes statistical analysis for predictor variables but significant reductions of cardiovascular events have been reported with the use of biological compared with conventional DMARDs in RA patients [41–43].

5. Study Limitations

The major limitation of this study is related with AC in MPS which was not performed in all examinations and this might have contributed to overestimating the prevalence of perfusion defects in some patients; however, AC might also introduce false-positive perfusion defects particularly among the female population.

On the other hand, there was no coronary anatomy control that can guarantee the atherosclerotic nature of all perfusion defects nor the presence of balanced ischemia.

The low representativeness of male and early RA patients precludes the extrapolation of obtained results to both genders and to patients with less disease duration.

6. Conclusions

A significant proportion of asymptomatic RA patients presented myocardial perfusion abnormalities in MPS. The association with BNP, OPG/RANKL ratio, and DKK-1 levels put in perspective the use of complementary approaches, including serum biomarkers quantification in CV risk stratification. Our results corroborated the hypothesis that MPS could reveal subclinical cardiac dysfunction and supported the utility of BNP measurement as a screening tool in CV risk assessment of RA patients.

More studies are needed to definitely evaluate the utility of different strategies (imaging, biomarkers) in the clinical setting, particularly in the era of increasing availability of RA biological therapies.

Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors wish to acknowledge Conceição Gonçalves (M.S.), Alexandra Bernardo (M.D.), and Sofia Pimenta (M.D.). This work was supported by the Associação Nacional de Reumatologia, Portugal.

References

- [1] H. R. Kramer and J. T. Giles, "Cardiovascular disease risk in rheumatoid arthritis: progress, debate, and opportunity," *Arthritis Care & Research*, vol. 63, no. 4, pp. 484–499, 2011.
- [2] J. Lindhardsen, O. Ahlehoff, G. H. Gislason et al., "The risk of myocardial infarction in rheumatoid arthritis and diabetes mellitus: a Danish nationwide cohort study," *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 70, no. 6, pp. 929–934, 2011.
- [3] J. A. Avina-Zubieta, J. Thomas, M. Sadatsafavi, A. J. Lehman, and D. Lacaille, "Risk of incident cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies," *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 71, no. 9, pp. 1524–1529, 2012.
- [4] M. J. L. Peters, V. P. Van Halm, A. E. Voskuyl et al., "Does rheumatoid arthritis equal diabetes mellitus as an independent risk factor for cardiovascular disease? A prospective study," *Arthritis Care and Research*, vol. 61, no. 11, pp. 1571–1579, 2009.
- [5] A. M. Kerola, M. J. Kauppi, T. Kerola, and T. V. M. Nieminen, "How early in the course of rheumatoid arthritis does the excess cardiovascular risk appear?" *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 71, no. 10, pp. 1606–1615, 2012.
- [6] E. Bartoloni, Y. Shoenfeld, and R. Gerli, "Inflammatory and autoimmune mechanisms in the induction of atherosclerotic damage in systemic rheumatic diseases: two faces of the same coin," *Arthritis Care and Research*, vol. 63, no. 2, pp. 178–183, 2011.
- [7] M. J. L. Peters, D. P. M. Symmons, D. McCarey et al., "EULAR evidence-based recommendations for cardiovascular risk management in patients with rheumatoid arthritis and other forms of inflammatory arthritis," *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 69, no. 2, pp. 325–331, 2010.
- [8] S. Mavrogeni, T. Dimitroulas, P. P. Sfikakis, and G. D. Kitas, "Heart involvement in rheumatoid arthritis: multimodality imaging and the emerging role of cardiac magnetic resonance," *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, vol. 43, no. 3, pp. 314–324, 2013.
- [9] S. A. Provan, K. Angel, A. G. Semb, D. Atar, and T. K. Kvien, "NT-proBNP predicts mortality in patients with rheumatoid arthritis: results from 10-year follow-up of the EURIDISS study," *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 69, no. 11, pp. 1946–1950, 2010.
- [10] R. Mogelvang, S. Haahr-Pedersen, M. Bjerre et al., "Osteoprotegerin improves risk detection by traditional cardiovascular risk factors and hsCRP," *Heart*, vol. 99, no. 2, pp. 106–110, 2013.
- [11] T. Sharir, G. Germano, X. Kang et al., "Prediction of myocardial infarction versus cardiac death by gated myocardial perfusion SPECT: risk stratification by the amount of stress-induced ischemia and the poststress ejection fraction," *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 42, no. 6, pp. 831–837, 2001.
- [12] W. Lieb, P. Gona, M. G. Larson et al., "Biomarkers of the osteoprotegerin pathway: clinical correlates, subclinical disease, incident cardiovascular disease, and mortality," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 30, no. 9, pp. 1849–1854, 2010.
- [13] T. Ueland, K. Otterdal, T. Lekva et al., "Dickkopf-1 enhances inflammatory interaction between platelets and endothelial cells and shows increased expression in atherosclerosis," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 29, no. 8, pp. 1228–1234, 2009.
- [14] E. C. Arnett, S. M. Edworthy, D. A. Bloch et al., "The American rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis," *Arthritis & Rheumatism*, vol. 31, no. 3, pp. 315–324, 1988.
- [15] M. L. L. Prevoo, M. A. Van 't Hof, H. H. Kuper, M. A. Van Leeuwen, L. B. A. Van De Putte, and P. L. C. M. Van Riel, "Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts: development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 38, no. 1, pp. 44–48, 1995.
- [16] A. Wolak, P. J. Slomka, M. B. Fish, S. Lorenzo, D. S. Berman, and G. Germano, "Quantitative diagnostic performance of myocardial perfusion SPECT with attenuation correction in women," *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 49, no. 6, pp. 915–922, 2008.
- [17] J. M. Links, L. C. Becker, and F. Anstett, "Clinical significance of apical thinning after attenuation correction," *Journal of Nuclear Cardiology*, vol. 11, no. 1, pp. 26–31, 2004.
- [18] R. Hachamovitch, D. S. Berman, L. J. Shaw et al., "Incremental prognostic value of myocardial perfusion single photon emission computed tomography for the prediction of cardiac death: differential stratification for risk of cardiac death and myocardial infarction," *Circulation*, vol. 97, no. 6, pp. 535–543, 1998.
- [19] K. J. Rothman, "No adjustments are needed for multiple comparisons," *Epidemiology*, vol. 1, no. 1, pp. 43–46, 1990.

- [20] M. A. Gonzalez-Gay, C. Gonzalez-Juanatey, J. A. Miranda-Filloy, C. Garcia-Porrúa, J. Llorca, and J. Martín, "Cardiovascular disease in rheumatoid arthritis," *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 60, no. 10, pp. 673–677, 2006.
- [21] P. J. Nicola, C. S. Crowson, H. Maradit-Kremers et al., "Contribution of congestive heart failure and ischemic heart disease to excess mortality in rheumatoid arthritis," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 54, no. 1, pp. 60–67, 2006.
- [22] E. Myasoedova, C. S. Crowson, P. J. Nicola et al., "The influence of rheumatoid arthritis disease characteristics on heart failure," *Journal of Rheumatology*, vol. 38, no. 8, pp. 1601–1606, 2011.
- [23] S. Momose, "Detection of myocardial lesions by dipyridamole thallium-201 scintigraphy in patients with rheumatoid arthritis," *Ryumachi*, vol. 35, no. 3, pp. 559–565, 1995.
- [24] G. Romero-Farina, J. Candell-Riera, S. Aguadé-Bruix et al., "Warranty periods for normal myocardial perfusion stress SPECT," *Journal of Nuclear Cardiology*, vol. 22, no. 1, pp. 44–54, 2015.
- [25] M. A. González-Gay and C. González-Juanatey, "Inflammation and lipid profile in rheumatoid arthritis: bridging an apparent paradox," *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 73, no. 7, pp. 1281–1284, 2014.
- [26] E. Myasoedova, C. S. Crowson, H. M. Kremers et al., "Lipid paradox in rheumatoid arthritis: the impact of serum lipid measures and systemic inflammation on the risk of cardiovascular disease," *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 70, no. 3, pp. 482–487, 2011.
- [27] M. A. Gonzalez-Gay, C. Gonzalez-Juanatey, A. Pífeiro, C. Garcia-Porrúa, A. Testa, and J. Llorca, "High-grade C-reactive protein elevation correlates with accelerated atherogenesis in patients with rheumatoid arthritis," *Journal of Rheumatology*, vol. 32, no. 7, pp. 1219–1223, 2005.
- [28] S. Hannawi, T. H. Marwick, and R. Thomas, "Inflammation predicts accelerated brachial arterial wall changes in patients with recent-onset rheumatoid arthritis," *Arthritis Research and Therapy*, vol. 11, no. 2, article R51, 2009.
- [29] H. Mirjafari, P. Welsh, S. M. M. Verstappen et al., "N-terminal pro-brain-type natriuretic peptide (NT-pro-BNP) and mortality risk in early inflammatory polyarthritis: results from the Norfolk Arthritis Registry (NOAR)," *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 73, no. 4, pp. 684–690, 2014.
- [30] A. Callegari, M. L. Coons, J. L. Ricks, M. E. Rosenfeld, and M. Scatena, "Increased calcification in osteoprotegerin-deficient smooth muscle cells: dependence on receptor activator of NF- κ B ligand and interleukin 6," *Journal of Vascular Research*, vol. 51, no. 2, pp. 118–131, 2014.
- [31] S. Morony, Y. Tintut, Z. Zhang et al., "Osteoprotegerin inhibits vascular calcification without affecting atherosclerosis in *ldl^r^{-/-}* mice," *Circulation*, vol. 117, no. 3, pp. 411–420, 2008.
- [32] C. Pérez de Ciriza, M. Moreno, P. Restituto et al., "Circulating osteoprotegerin is increased in the metabolic syndrome and associates with subclinical atherosclerosis and coronary arterial calcification," *Clinical Biochemistry*, vol. 47, no. 18, pp. 272–278, 2014.
- [33] M. Bjerre, J. Hilden, J. Kastrup et al., "Osteoprotegerin independently predicts mortality in patients with stable coronary artery disease: The CLARICOR trial," *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, vol. 74, no. 8, pp. 657–664, 2014.
- [34] R. Røysland, S. Masson, T. Omland et al., "Prognostic value of osteoprotegerin in chronic heart failure: the GISSI-HF trial," *American Heart Journal*, vol. 160, no. 2, pp. 286–293, 2010.
- [35] W. J. Sandberg, A. Yndestad, E. Øie et al., "Enhanced T-cell expression of RANK ligand in acute coronary syndrome: possible role in plaque destabilization," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 26, no. 4, pp. 857–863, 2006.
- [36] L. Wang, X. B. Hu, W. Zhang et al., "Dickkopf-1 as a novel predictor is associated with risk stratification by GRACE risk scores for predictive value in patients with acute coronary syndrome: a retrospective research," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 1, Article ID e54731, 2013.
- [37] S. Lattanzio, F. Santilli, R. Liani et al., "Circulating dickkopf-1 in diabetes mellitus: association with platelet activation and effects of improved metabolic control and low-dose aspirin," *Journal of the American Heart Association*, vol. 3, no. 4, Article ID e001000, 2014.
- [38] J. B. Cannata-Andía, P. Roman-García, and K. Hruska, "The connections between vascular calcification and bone health," *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 26, no. 11, pp. 3429–3436, 2011.
- [39] G. Goliasch, F. Wiesbauer, S. P. Kastl et al., "Premature myocardial infarction is associated with low serum levels of Wnt-1," *Atherosclerosis*, vol. 222, no. 1, pp. 251–256, 2012.
- [40] K.-I. Kim, K. U. Park, E. J. Chun et al., "A novel biomarker of coronary atherosclerosis: serum DKK1 concentration correlates with coronary artery calcification and atherosclerotic plaques," *Journal of Korean Medical Science*, vol. 26, no. 9, pp. 1178–1184, 2011.
- [41] C. L. Morgan, P. Emery, D. Porter et al., "Treatment of rheumatoid arthritis with etanercept with reference to disease-modifying anti-rheumatic drugs: long-term safety and survival using prospective, observational data," *Rheumatology (United Kingdom)*, vol. 53, no. 1, pp. 186–194, 2014.
- [42] W. G. Dixon, K. D. Watson, M. Lunt et al., "Reduction in the incidence of myocardial infarction in patients with rheumatoid arthritis who respond to anti-tumor necrosis factor α therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 56, no. 9, pp. 2905–2912, 2007.
- [43] J. D. Greenberg, J. M. Kremer, J. R. Curtis et al., "Tumour necrosis factor antagonist use and associated risk reduction of cardiovascular events among patients with rheumatoid arthritis," *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 70, no. 4, pp. 576–582, 2011.

2.2. Coronary artery calcium score in rheumatoid arthritis patients: associations with apolipoproteins and disease biomarkers

M Bernardes, A Madureira, A Oliveira, MJ Martins, R Lucas, L Costa, JG Pereira, F Ventura, I Ramos, E Martins. Coronary artery calcium score in Rheumatoid Arthritis patients: associations with apolipoproteins and disease biomarkers.

(submetido à revista Int J Rheum Dis em setembro de 2017)



Coronary artery calcium score in Rheumatoid Arthritis patients: associations with apolipoproteins and disease biomarkers

Journal:	<i>International Journal of Rheumatic Diseases</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Bernardes, Miguel; São João Hospital Centre, Rheumatology; Faculty of Medicine, University of Porto, Medicine Madureira, Antonio; São João Hospital Centre, Radiology Oliveira, Ana; São João Hospital Centre, Nuclear Medicine Martins, Maria João ; Faculty of Medicine of University of Porto, Biomedicine, Unit of Biochemistry; Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (i3s), University of Porto, Porto, Portugal Lucas, Raquel; University of Porto Medical School, Department of Clinical Epidemiology, Predictive Medicine and Public Health; University of Porto Medical School, Public Health Institute Costa, Lúcia; S. João Hospital, EPE, Rheumatology Department Pereira, Jorge; São João Hospital Centre, Nuclear Medicine Ventura, Francisco; Faculty of Medicine, University of Porto, Medicine Ramos, Isabel; São João Hospital Centre, Radiology; Faculty of Medicine, University of Porto, Medicine Martins, Elisabete; São João Hospital Centre, Cardiology; Faculty of Medicine, University of Porto, Medicine
Keywords:	Rheumatoid arthritis, Clinical aspects < Rheumatoid arthritis

SCHOLARONE™
Manuscripts

**Title: Coronary artery calcium score in Rheumatoid Arthritis patients:
associations with apolipoproteins and disease biomarkers**

Running title: Coronary calcium score in Rheumatoid Arthritis

Authors

1. Bernardes, Miguel; MD, MSc (corresponding author)

Department of Rheumatology, São João Hospital Centre;

Department of Medicine, Faculty of Medicine, University of Porto,

Alameda Prof. Hernâni Monteiro, 4200-319 Porto, Portugal

mbernardes09@gmail.com

+351933268170

2. J. Madureira, António; MD

Department of Radiology, São João Hospital Centre;

Medicine Department, Faculty of Medicine, University of Porto

Porto, Portugal

ajbmadureira@gmail.com

3. Oliveira, Ana; MD

Department of Nuclear Medicine, São João Hospital Centre, Porto, Portugal

anacoliveira@gmail.com

4. Martins, Maria João; MSc, PhD

Department of Biomedicine, Unit of Biochemistry, Faculty of Medicine of University of Porto; Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (i3s), University of Porto, Porto, Portugal

mmartins@med.up.pt

5. Lucas, Raquel; MSc, PhD

EPIUnit-Institute of Public Health, University of Porto, Porto, Portugal;

Department of Clinical Epidemiology, Predictive Medicine and Public Health, Faculty of Medicine, University of Porto, Porto, Portugal

rlucas@med.up.pt

6. Costa, Lúcia; MD

Department of Rheumatology, São João Hospital Centre, Porto, Portugal

dias.costa.ml@gmail.com

7. G. Pereira, Jorge; MD

Department of Nuclear Medicine, São João Hospital Centre, Porto, Portugal

jorgegppereira@gmail.com

8. Ventura, Francisco; MD, PhD

Faculty of Medicine of University of Porto, Porto, Portugal

fsventura@zonmail.pt

9. Ramos, Isabel; MD, PhD

Department of Radiology, São João Hospital Centre;

Department of Medicine, Faculty of Medicine, University of Porto,

Porto, Portugal

radiologia.hsj@gmail.com

10. Martins, Elisabete; MD, PhD

Department of Medicine, Faculty of Medicine, University of Porto;

Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (i3s), University of Porto;

Department of Cardiology, São João Hospital Centre,

Porto, Portugal

elisabetemartins09@gmail.com

All authors participated in the conception and revision of the manuscript:

- Bernardes M., Martins E., Ventura F. and Martins M.J. had substantial contributions to study conception and design.
- Bernardes M., J. Madureira A., Oliveira A., Costa L., Ramos I., G. Pereira J. and Martins M.J. had substantial contributions to acquisition of data.
- Bernardes M., Lucas R., J. Madureira A., Martins M.J. and Martins E. had substantial contributions to analysis and interpretation of data.
- Bernardes M., Lucas R., Martins M.J. and Martins E. had substantial contributions to the draft of the article and in revising it critically for important intellectual content.

Abstract

Aims and methods: In rheumatoid arthritis (RA), cardiovascular (CV) comorbidities are a major cause of mortality. Coronary calcium score (CCS) assessed by computed tomography has been associated with RA prognosis. In this work, we aimed to assess CCS in RA patients and determine their associations with different clinical, laboratory and imaging disease parameters.

Results: We evaluated 78 patients, with a mean age of 53.4 ± 11.1 years, 76.9% females, with a mean DAS28 (4v) and HAQ of 4.359 ± 1.309 and 1.375 ± 0.664 , respectively, and disease duration of 14.1 ± 9.9 years.

Mean CCS value was 46.133 ± 122.892 . CCS > 10 was significantly associated to CV risk factors [age (OR= 1.076; $p=0.004$), BMI ≥ 30 Kg/m² (OR= 0.072; $p=0.017$), HDL (OR= 0.016; $p=0.015$), LDL/HDL ratio (OR= 1.767; $p=0.045$), apolipoprotein A1 (ApoA1) (OR=0.970; $p=0.009$); apolipoprotein B/ApoA1 (ApoB/ApoA1) ratio (OR= 28.657; $p=0.011$), homocysteine (OR= 1.176; $p=0.038$), statins use (OR=3.413; $p=0.03$) and diabetes (OR= 13.429; $p=0.019$), disease activity [C Reactive-Protein (CRP) (OR= 1.046; $p=0.022$), DAS(4v) (OR= 1.584; $p=0.019$) and SHS erosion score (OR= 1.012; $p=0.018$)], biomarkers [(Dkk-1 (OR=1.014; $p=0.017$) and OPG (OR= 1.381; $p=0.031$)], bone mineral density [femoral (OR=0.012; $p=0.014$), lumbar spine (OR=0.009; $p=0.006$)] and osteoporosis (OR=5.476; $p=0.012$). After adjustment for age, gender and BMI, significant associations were maintained with ApoA1, ApoB/ApoA1 ratio, statins use, CRP, DAS(4v) and Dkk-1.

Conclusions: Our work reinforces the hypothesis that in RA, CCS may be a useful tool in cardiovascular risk assessment, particularly valuable in poorer controlled patients with certain lipoprotein profile.

Key-Words: Biological markers; Bone mineral density; Cardiovascular diseases; Heart diseases; Rheumatoid arthritis

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a clinical syndrome characterized by synovial inflammation and joint damage, which can have extra-articular manifestations, including in the cardiovascular system (1). Cardiovascular (CV) comorbidities are indeed a major cause of mortality in RA patients and the relative risk of myocardial infarction is 1.5, against the general population (2). However, prediction of cardiovascular events in RA is far from being ideal, as has been shown in different studies (3, 4). A deeper understanding of the mechanisms involved in vascular remodeling, including coronary calcification, is fundamental for the development of efficacious prevention strategies of CV disease in RA.

Coronary calcium score (CCS) assessed by computed tomography is a measure of coronary artery calcification (CAC), a process that occurs in advanced stages of the atherosclerotic disease. CCS is a surrogate marker of coronary atherosclerotic burden and has an important role in risk stratification for coronary events (5, 6), better than combinations of the traditional cardiovascular risk factors (7). In clinical practice, CCS is particularly useful in patients with moderate risk where there is uncertainty about statin initiation (8, 9).

In RA patients, it is still unknown how CCS could be used in CV risk stratification beyond the current recommendations of the European League Against Rheumatism (EULAR) (10). CCS has been associated with the prognosis in RA patients (11), but the ability of the different CV risk scores, such as Framingham or ACC/AHA 10-year risk, to detect those with a high CCS category did not differ significantly and fail in the identification of a significant proportion of RA patients with a higher CCS (12, 13).

In RA patients, it is known that CAC is more frequent and severe than in age- and gender-matched control subjects (11, 14, 15), more common in established RA (16) and in those with more severe disease (17), and relates with the number and severity of coronary stenosis (18). The risk of CAC progression seems to be also higher in RA patients than in the general population (19).

It is unclear how the pathophysiologic mechanisms involved in RA, such as chronic systemic inflammation or bone metabolism disturbances, may be associated with coronary disease progression and calcification. Previously, different proinflammatory cytokines, such as TNF and IL-6, (20) and postulated mediators of vascular calcification, such as osteoprotegerin (OPG) (21), have been associated with the severity of CCS in RA patients.

In this work, we aimed to assess CCS in patients with established RA and determine the associations of CCS value with different clinical, laboratory and imaging disease parameters.

Materials and methods

• Rheumatoid Arthritis patients

Through a Rheumatology appointment, patients with established RA were consecutively included in the study protocol. The exclusion criteria were past history of ischemic heart disease, presence of angina, heart failure and/or Q waves on the electrocardiogram at baseline visit. RA was diagnosed according to the American College of Rheumatology 1987 criteria (22). RA disease activity was measured using the Disease Activity Score (DAS28) four variables (4v) (23). DAS28(4v) with C-reactive protein (CRP), instead of erythrocyte sedimentation rate (ESR), and DAS28 three variables (3v), with ESR and with CRP, were also calculated. The Portuguese version of the Stanford Health Assessment Questionnaire (HAQ) was used to assess functional disability.

All available data, including the past and ongoing medications, such as cardiovascular drugs, corticosteroids or immunosuppressants, were collected. Hypertension was defined as systolic blood pressure ≥ 140 mmHg, diastolic blood pressure ≥ 90 mmHg or taking antihypertensive medication, dyslipidemia as total cholesterol ≥ 200 mg/dl or taking antidyslipidemic agents, diabetes as a fasting glucose ≥ 126 mg/dl or taking hypoglycemic agents (24-26). The population here included integrates a larger group already characterized in terms of myocardial perfusion scintigraphy (4).

• Ethics

Written informed consent was obtained from all study participants, and the protocol was approved by the Institutional Review Board in accordance with the principles of the 1975 Declaration of Helsinki (São João Hospital Centre, Comissão de Ética para a Saúde (CES) approval on March 13, 2008).

• Laboratory parameters

Lipid profile, glucose, insulin, CRP, ESR, rheumatoid factor (RF) and anti-CCP antibodies (ACPA), homocysteine, uric acid, 25(OH) vitamin D3, parathyroid hormone, osteocalcin, beta-carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen (beta-CTX), serotonin, B-Type natriuretic peptide (BNP), osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL), dickkopf-1 (Dkk-1) and sclerostin levels were analyzed in a fasting blood sample. OPG, RANKL, Dkk-1 and sclerostin were measured as described previously (4). Homeostasis model assessment for insulin resistance (HOMA IR) was calculated, using the formula: $HOMA\ IR = [fasting\ insulin\ (mIU/L) \times fasting\ glucose\ (mg/dL) / 405]$ (27).

- **Radiographic evaluation**

Radiographs of the hands (with wrists and phalanges) and feet, obtained in the posterior-anterior view, were scored by one trained reader, blinded for patient clinical variables and treatment allocation. The modified Sharp/van der Heijde Score (SHS) was used for the scoring of joint space narrowing (JSN) and erosiveness on the radiographs (28).

- **Bone mineral density measurement**

Bone mineral density (BMD) at total left proximal femur, lumbar spine (L1-L4) and left hand were measured by Dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) (LUNAR Expert XL) according to a standardized procedure for each site. For spine BMD measurements, in the L1-L4 posterior-anterior view, vertebrae affected by local structural change or artifact were excluded, till a maximum of two. The entire hand (including the wrist bones) was included in the analysis and measurements were made using the "Hand" software package on GE Lunar scanners. The same technician performed all DXA scans and the coefficients of variation of repeated BMD measurements ranged from 0,9 to 1,5% at the different anatomical locations.

- **Coronary calcium score**

All patients underwent imaging of coronary arteries using a 64-slice computed tomography scanner, Somatom Sensation Cardiac 64 (Siemens, Germany), for a total of 2.3 mSv of radiation exposure. The presence of coronary calcification was evaluated by Argus software and CCS score was calculated as described by Agatston et al (29). All the scans were read by a single expert investigator, blinded for the subjects' clinical profile. Patients were further stratified into two groups according to their CCS value ≤ 10 or >10 .

- **Statistical methods**

Qualitative data are described as absolute counts and proportions and quantitative data as mean (\pm standard deviation). To assess the associations between clinical and laboratorial variables and CCS, logistic regression models were used in order to estimate crude odds ratios (OR) and their 95% confidence intervals (CI). OR adjusted for the influence of confounders [age, sex and body mass index (BMI)] were also calculated. All analysis were two-sided and p-values <0.05 were considered statistically significant. Since this study was oriented by a priori-defined hypotheses no

adjustments for multiple comparisons were conducted, as supported by previous literature (30). Statistical analyses were performed using STATA software V.11 (Statacorp, College Station, Texas, USA)

Results

Patient characteristics

We evaluated 78 patients, with a mean age of 53.4 ± 11.1 years, 76.9% females, with a mean DAS28 (4v) and HAQ of 4.359 ± 1.309 and 1.375 ± 0.664 , respectively, and a disease duration of 14.1 ± 9.9 years. According to DAS28(4v), 23% of the patients were in low disease activity. All sample presented an erosive disease. The majority of patients were seropositive for RF (58%) and ACPA (76%). Extra-articular manifestations were present in 39% of them. Clinical and laboratory variables distribution are shown in table 1.

Normal or near normal CCS values (≤ 10) were present in 64% of the patients. CAC was detected in 41 (53%) patients [$1 < \text{CCS} \leq 10$: 13 (17%); $10 < \text{CCS} \leq 100$: 17 (22%); $100 < \text{CCS} \leq 400$: 9 (11%); $\text{CCS} > 400$: 2 (3%)]. For the whole sample, CCS mean value was 46.133 ± 122.892 , more frequently involving the left anterior descending coronary artery (table 2).

On logistic regression analysis, the presence of a CCS value > 10 was associated to age (OR= 1.076; $p=0.004$), BMI $\geq 30 \text{ Kg/m}^2$ (OR= 0.072; $p=0.017$), HDL (OR= 0.016; $p=0.015$), LDL/HDL ratio (OR= 1.767; $p=0.045$), apolipoprotein A1 (ApoA1) (OR=0.970; $p=0.009$), apolipoprotein B/ApoA1 (ApoB/ApoA1) ratio (OR= 28.657; $p=0.011$), homocysteine (OR= 1.176; $p=0.038$), diabetes mellitus (OR= 13.429; $p=0.019$), statins use (OR=3.413; $p=0.03$) and antidiabetics use (OR=13.364; $p=0.020$). CCS > 10 was also associated with some disease activity parameters: C Reactive-Protein (CRP) (OR= 1.046; $p=0.022$), DAS(4v) (OR= 1.584; $p=0.019$), DAS(4v; CRP) (OR= 1.558; $p=0.022$) and SHS erosion score (OR= 1.012; $p=0.018$). The presence of a CCS value > 10 was also related to novel biomarkers (Dkk-1 (OR=1.014; $p=0.017$) and OPG (OR= 1.381; $p=0.031$)), DXA parameters (total left proximal femur BMD (OR=0.012; $p=0.014$) and lumbar spine BMD (OR=0.009; $p=0.006$)) and the presence of osteoporosis (OR=5.476; $p=0.012$). After adjustment for age and gender, significant associations were maintained with BMI, HDL, ApoA1, ApoB/ApoA1 ratio, CRP, DAS(4v), DAS(4v; CRP), SHS erosion score, Dkk-1, total left proximal femur BMD and lumbar spine BMD. A significant association with total SHS also emerged (OR=1.007; $p=0.044$). After adjustment for age, gender and BMI, only remained significant the associations with ApoA1, ApoB/ApoA1 ratio, statins use, CRP, DAS(4v), DAS(4v; CRP) and Dkk-1. Table 3 shows the unadjusted and adjusted OD ratios obtained for all the analyzed variables.

Discussion

In RA patients, CCS has been associated with different CV risk factors, disease inflammatory biomarkers and bone density parameters (16, 17), but clinical predictors of higher CAC have not been fully identified.

In our work, we expand that knowledge, describing the associations between CCS and different clinical and laboratory variables. Among our sample of RA patients, the major finding was the strongest relation between ApoB/ApoA1 ratio and CCS amongst several others disease-related and CV risk factors.

• CCS and atherosclerotic risk factors

Lipid profile is known to be altered in the presence of RA and also modifies under disease-specific therapies. Among RA patients, lower levels of total cholesterol and LDL are associated with higher CV risk, this is termed the “lipid paradox”, and treatments aimed at reducing inflammation are associated with an overall reduction in CV risk, despite increases in LDL-C levels (31). The levels of apolipoproteins, namely ApoB, could be discordant with LDL-cholesterol measurements (32) and may be more useful in cardiovascular risk assessment in these patients (33), relating to the inflammatory state and not responding in the same way to statins treatment (34).

Ohman M et al have already reported that, in a long term follow-up study of patients with active RA, ApoB/ApoA1 ratio was a key predictor of cardiovascular events (35). Our work reinforces this association, establishing a link between apolipoproteins ratio, higher CCS values and the risk of cardiovascular events.

We also found that ApoA1 levels and BMI were independently associated with CCS. In our sample, the relations with other CV risk parameters such as HDL, homocysteine or diabetes mellitus were lost after adjustments for age, gender, and BMI.

The negative association of ApoA1 with CCS can be related to the fact that, as a major component of HDL, Apo A1 has an anti-atherogenic protective function, beyond anti-inflammatory properties (36).

The unexpectedly negative relation with BMI can be explained by the fact that obese patients may represent those with a well-controlled RA in a sustained manner and, on the other hand, patients with under- or normal-weight those with a more active inflammation over time (37, 38). In a chronic kidney disease cohort of patients, high BMI was also not

associated with the presence, extent or progression of coronary calcification (39). Unfortunately, we did not measure adipocytokines associated with adipose tissue and inflammation (40), although their concentrations or characteristics seems also independent of BMI in RA (41, 42).

• CCS and disease activity parameters

In our cohort, we found significant associations between disease activity parameters (DAS(4v), DAS4vPCr, and CRP) and CCS. The score of total erosions was also related with CCS and this score is considered a marker of disease severity.

Different studies have implicated systemic inflammation as a risk factor for atherosclerosis. Inflammatory cytokines may participate in atherogenesis and promote acute CV events (43).

Inflammation is marked and sustained in RA, with persistent plasma CRP levels clearly above the threshold of high-sensitivity CRP, which is commonly assessed in non-selected populations. In RA, inflammatory biomarkers were associated with increased CAC in nondiabetic women (44) and with the carotid intima-media thickness measurements (45). Disease activity scores were also associated with the occurrence of CV events in RA (46, 47).

Our results reinforce the hypothesis that a non-controlled inflammatory state may promote coronary disease and calcification and the consequent CV risk. A tight control of RA disease activity is a major target for CV risk reduction strategies in RA patients.

• CCS and bone density and bone metabolism biomarkers

In our RA sample, CCS was inversely associated with bone mineral density (BMD) at different anatomical sites in crude analysis, although these associations were lost after adjustments for age, gender, and BMI in multivariate analysis.

The inverse relationship between bone density and coronary calcification has been described in several different clinical contexts (48-50), suggesting that the plaque calcification and bone demineralization share common pathophysiological mechanisms. However, in other studies, associations between CCS and BMD were also not always maintained after adjustments to factors that could affect more CCS (51).

On the other hand, Dkk-1 and OPG are known mediators involved in bone metabolism and inflammation; Dkk-1 inhibits osteoblasts maturation, induces osteoclast differentiation, and lowers the OPG levels. In turn, lower levels of OPG, enhance the RANKL-RANK interaction, promotes the differentiation and activation of osteoclasts and bone reabsorption, and may inhibit the process of calcification (52). OPG also inhibits TRAIL-induced apoptosis in vascular cells and may directly be related to plaque instability (53).

The relationships between these mediators and coronary disease including the calcification process are less well established (54), although they have been considered significant players in the apparent paradox of the simultaneous occurrence of osteoporosis and vascular calcification(55). In inflammatory diseases, such as RA, it is unknown how enhanced baseline levels of both OPG and Dkk-1, relate with coronary disease.

Higher levels of OPG have been associated with CV risk and coronary calcification in the general population (56), in type 2 diabetics (57) and patients with chronic kidney disease (58). Recently, in Systemic lupus erythematosus, OPG was associated with subclinical markers of atherosclerosis, including CCS, but this relation was lost after the adjustment for age (59). In our RA sample, the relation of OPG with CCS was also not statistically significant after adjustment for age and gender.

By contrast, in our study, the relation with Dkk-1 was maintained after multivariate analysis. Until now, few studies allow definitive conclusions about the role of Dkk-1 level in CV risk assessment. Dkk-1 has been correlated with CCS in a noninflammatory disease population (60) however, in another study, the presence of coronary atherosclerosis was related to a significantly lower Dkk-1 level (61).

The conflicting results obtained with these biomarkers (OPG and Dkk-1) reinforces the need for more studies in order to obtain conclusive data about their clinical utility in CV risk assessment in RA patients.

Study limitations

The major limitations of our findings are related to the small sample size and the cross-sectional nature of the study. It would have been interesting to explore more the apparent inverse relationship between CAC and BMI since adipose tissue has already established functions in inflammation and as an endocrine player. For this purpose, adipokines evaluation would have been an added value. Also, the low representativeness of male RA patients precludes the extrapolation of the obtained results to both genders.

Conclusions

In established RA, a significant proportion of patients (36% in our study) presents a CCS > 10. RA patients with a more active inflammation and high ApoB/ApoA1 ratio seem to have a greater risk for CAC. Our work reinforces the hypothesis that in RA, CCS may be a useful tool in CV risk assessment, particularly valuable in those patients with a poorer controlled inflammation and with a particular profile of serum lipoproteins. Further studies are needed to explore

the pathophysiological links between serum apolipoproteins, systemic inflammation, and vascular atherosclerosis in order to develop efficacious preventive CV risk strategies.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Funding

This study was supported by Associação Nacional de Reumatologia, Portugal.

References

1. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2010;376(9746):1094-108.
2. Avina-Zubieta JA, Choi HK, Sadatsafavi M, Etmann M, Esdaile JM, Lacaille D. Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Arthritis Rheum*. 2008;59(12):1690-7.
3. Crowson CS, Rollefstad S, Kitas GD, van Riel PL, Gabriel SE, Semb AG, et al. Challenges of developing a cardiovascular risk calculator for patients with rheumatoid arthritis. *PLoS One*. 2017;12(3):e0174656.
4. Bernardes M, Vieira TS, Martins MJ, Lucas R, Costa L, Pereira JG, et al. Myocardial Perfusion in Rheumatoid Arthritis Patients: Associations with Traditional Risk Factors and Novel Biomarkers. *Biomed Res Int*. 2017;2017:6509754.
5. Geisel MH, Bauer M, Hennig F, Hoffmann B, Lehmann N, Mohlenkamp S, et al. Comparison of coronary artery calcification, carotid intima-media thickness and ankle-brachial index for predicting 10-year incident cardiovascular events in the general population. *Eur Heart J*. 2017.
6. McClelland RL, Jorgensen NW, Budoff M, Blaha MJ, Post WS, Kronmal RA, et al. 10-Year Coronary Heart Disease Risk Prediction Using Coronary Artery Calcium and Traditional Risk Factors: Derivation in the MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis) With Validation in the HNR (Heinz Nixdorf Recall) Study and the DHS (Dallas Heart Study). *J Am Coll Cardiol*. 2015;66(15):1643-53.

- 1
2 7. Korley FK, Gatsonis C, Snyder BS, George RT, Abd T, Zimmerman SL, et al. Clinical risk factors alone
3 are inadequate for predicting significant coronary artery disease. *J Cardiovasc Comput Tomogr.* 2017.
4
- 5 8. Goff DC, Jr., Lloyd-Jones DM, Bennett G, Coady S, D'Agostino RB, Sr., Gibbons R, et al. 2013
6 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of
7 Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63(25 Pt
8 B):2935-59.
9
- 10 9. Perk J, De Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren M, et al. European Guidelines on
11 cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the
12 European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical
13 Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur Heart J.*
14 2012;33(13):1635-701.
15
- 16 10. Peters MJ, Symmons DP, McCarey D, Dijkmans BA, Nicola P, Kvien TK, et al. EULAR evidence-based
17 recommendations for cardiovascular risk management in patients with rheumatoid arthritis and other
18 forms of inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(2):325-31.
19
- 20 11. Yiu KH, Mok MY, Wang S, Ooi GC, Khong PL, Lau CS, et al. Prognostic role of coronary calcification in
21 patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol.* 2012;30(3):345-
22 50.
23
- 24 12. Crowson CS, Matteson EL, Roger VL, Therneau TM, Gabriel SE. Usefulness of risk scores to estimate
25 the risk of cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. *Am J Cardiol.* 2012;110(3):420-4.
26
- 27 13. Kawai VK, Chung CP, Solus JF, Oeser A, Raggi P, Stein CM. The ability of the 2013 American College
28 of Cardiology/American Heart Association cardiovascular risk score to identify rheumatoid arthritis patients
29 with high coronary artery calcification scores. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(2):381-5.
30
- 31 14. Karpouzas GA, Malpeso J, Choi TY, Li D, Munoz S, Budoff MJ. Prevalence, extent and composition of
32 coronary plaque in patients with rheumatoid arthritis without symptoms or prior diagnosis of coronary
33 artery disease. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(10):1797-804.
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

15. Wang S, Yiu KH, Mok MY, Ooi GC, Khong PL, Mak KF, et al. Prevalence and extent of calcification over aorta, coronary and carotid arteries in patients with rheumatoid arthritis. *J Intern Med*. 2009;266(5):445-52.
16. Chung CP, Oeser A, Raggi P, Gebretsadik T, Shintani AK, Sokka T, et al. Increased coronary-artery atherosclerosis in rheumatoid arthritis: relationship to disease duration and cardiovascular risk factors. *Arthritis Rheum*. 2005;52(10):3045-53.
17. Giles JT, Szklo M, Post W, Petri M, Blumenthal RS, Lam G, et al. Coronary arterial calcification in rheumatoid arthritis: comparison with the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(2):R36.
18. Hromadka M, Seidlerova J, Baxa J, Suchy D, Rajdl D, Sedivy J, et al. Relationship between hsTnI and coronary stenosis in asymptomatic women with rheumatoid arthritis. *BMC Cardiovasc Disord*. 2016;16(1):184.
19. Liu JH, Ng MY, Cheung T, Chung HY, Chen Y, Zhen Z, et al. Ten-year progression of coronary artery, carotid artery, and aortic calcification in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2017;36(4):807-16.
20. Rho YH, Chung CP, Oeser A, Solus J, Asanuma Y, Sokka T, et al. Inflammatory mediators and premature coronary atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009;61(11):1580-5.
21. Asanuma Y, Chung CP, Oeser A, Solus JF, Avalos I, Gebretsadik T, et al. Serum osteoprotegerin is increased and independently associated with coronary-artery atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis*. 2007;195(2):e135-41.
22. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 1988;31(3):315-24.
23. Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 1995;38(1):44-8.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
24. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Bohm M, et al. 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *European heart journal*. 2013;34(28):2159-219.
25. European Association for Cardiovascular P, Rehabilitation, Reiner Z, Catapano AL, De Backer G, Graham I, et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J*. 2011;32(14):1769-818.
26. Authors/Task Force M, Ryden L, Grant PJ, Anker SD, Berne C, Cosentino F, et al. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur Heart J*. 2013;34(39):3035-87.
27. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412-9.
28. van der Heijde D. How to read radiographs according to the Sharp/van der Heijde method. *J Rheumatol*. 2000;27(1):261-3.
29. Oudkerk M, Stillman AE, Halliburton SS, Kalender WA, Mohlenkamp S, McCollough CH, et al. Coronary artery calcium screening: current status and recommendations from the European Society of Cardiac Radiology and North American Society for Cardiovascular Imaging. *Eur Radiol*. 2008;18(12):2785-807.
30. Rothman KJ. No adjustments are needed for multiple comparisons. *Epidemiology*. 1990;1(1):43-6.
31. Myasoedova E, Crowson CS, Kremers HM, Roger VL, Fitz-Gibbon PD, Thorneau TM, et al. Lipid paradox in rheumatoid arthritis: the impact of serum lipid measures and systemic inflammation on the risk of cardiovascular disease. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(3):482-7.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
32. Wilkins JT, Li RC, Sniderman A, Chan C, Lloyd-Jones DM. Discordance Between Apolipoprotein B and LDL-Cholesterol in Young Adults Predicts Coronary Artery Calcification: The CARDIA Study. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67(2):193-201.
33. Liao KP, Playford MP, Frits M, Coblyn JS, Iannaccone C, Weinblatt ME, et al. The association between reduction in inflammation and changes in lipoprotein levels and HDL cholesterol efflux capacity in rheumatoid arthritis. *J Am Heart Assoc*. 2015;4(2).
34. Knowlton N, Wages JA, Centola MB, Alaupovic P. Apolipoprotein-defined lipoprotein abnormalities in rheumatoid arthritis patients and their potential impact on cardiovascular disease. *Scand J Rheumatol*. 2012;41(3):165-9.
35. Ohman M, Ohman ML, Wallberg-Jonsson S. The apoB/apoA1 ratio predicts future cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*. 2014;43(4):259-64.
36. Terkeltaub R. Apolipoprotein a-I at the interface of vascular inflammation and arthritis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(3):474-6.
37. Kerekes G, Nurmohamed MT, Gonzalez-Gay MA, Seres I, Paragh G, Kardos Z, et al. Rheumatoid arthritis and metabolic syndrome. *Nat Rev Rheumatol*. 2014;10(11):691-6.
38. Stavropoulos-Kalinoglou A, Metsios GS, Koutedakis Y, Kitas GD. Obesity in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50(3):450-62.
39. Russo D, Morrone LF, Errichiello C, De Gregorio MG, Imbriaco M, Battaglia Y, et al. Impact of BMI on cardiovascular events, renal function, and coronary artery calcification. *Blood Purif*. 2014;38(1):1-6.
40. Rho YH, Chung CP, Solus JF, Raggi P, Oeser A, Gebretsadik T, et al. Adipocytokines, insulin resistance, and coronary atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010;62(5):1259-64.
41. Rho YH, Solus J, Sokka T, Oeser A, Chung CP, Gebretsadik T, et al. Adipocytokines are associated with radiographic joint damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009;60(7):1906-14.
42. Giles JT, Danielides S, Szklo M, Post WS, Blumenthal RS, Petri M, et al. Insulin resistance in rheumatoid arthritis: disease-related indicators and associations with the presence and progression of subclinical atherosclerosis. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(3):626-36.

- 1
2 43. Gregersen I, Holm S, Dahl TB, Halvorsen B, Aukrust P. A focus on inflammation as a major risk factor
3 for atherosclerotic cardiovascular diseases. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2016;14(3):391-403.
4
5
6 44. Kao AH, Wasko MC, Krishnaswami S, Wagner J, Edmundowicz D, Shaw P, et al. C-reactive protein
7 and coronary artery calcium in asymptomatic women with systemic lupus erythematosus or rheumatoid
8 arthritis. *Am J Cardiol.* 2008;102(6):755-60.
9
10
11 45. Nowak B, Madej M, Luczak A, Malecki R, Wiland P. Disease Activity, Oxidized-LDL Fraction and Anti-
12 Oxidized LDL Antibodies Influence Cardiovascular Risk in Rheumatoid Arthritis. *Adv Clin Exp Med.*
13 2016;25(1):43-50.
14
15
16 46. Arts EE, Fransen J, den Broeder AA, Poppa CD, van Riel PL. The effect of disease duration and disease
17 activity on the risk of cardiovascular disease in rheumatoid arthritis patients. *Ann Rheum Dis.*
18 2015;74(6):998-1003.
19
20
21 47. Mantel A, Holmqvist M, Nyberg F, Tornling G, Frisell T, Alfredsson L, et al. Risk factors for the rapid
22 increase in risk of acute coronary events in patients with new-onset rheumatoid arthritis: a nested case-
23 control study. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(11):2845-54.
24
25
26 48. Bellasi A, Zona S, Orlando G, Carli F, Ligabue G, Rochira V, et al. Inverse correlation between
27 vascular calcification and bone mineral density in human immunodeficiency virus-infected patients. *Calcif*
28 *Tissue Int.* 2013;93(5):413-8.
29
30
31 49. Filgueira A, Carvalho AB, Tomiyama C, Higa A, Rochitte CE, Santos RD, et al. Is coronary artery
32 calcification associated with vertebral bone density in nondialyzed chronic kidney disease patients? *Clin J*
33 *Am Soc Nephrol.* 2011;6(6):1456-62.
34
35
36 50. Xu R, Yang HN, Li YQ, Wang QF, Guo AH, Ayiti A, et al. Association of coronary artery calcium with
37 bone mineral density in postmenopausal women. *Coron Artery Dis.* 2016;27(7):586-91.
38
39
40 51. Kim KI, Suh JW, Choi SY, Chang HJ, Choi DJ, Kim CH, et al. Is reduced bone mineral density
41 independently associated with coronary artery calcification in subjects older than 50 years? *J Bone Miner*
42 *Metab.* 2011;29(3):369-76.
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
52. Callegari A, Coons ML, Ricks JL, Rosenfeld ME, Scatena M. Increased calcification in osteoprotegerin-deficient smooth muscle cells: Dependence on receptor activator of NF-kappaB ligand and interleukin 6. *J Vasc Res.* 2014;51(2):118-31.
53. Bernardi S, Bossi F, Toffoli B, Fabris B. Roles and Clinical Applications of OPG and TRAIL as Biomarkers in Cardiovascular Disease. *Biomed Res Int.* 2016;2016:1752854.
54. Quercioli A, Montecucco F, Bertolotto M, Ottonello L, Pende A, Mach F, et al. Coronary artery calcification and cardiovascular risk: the role of RANKL/OPG signalling. *Eur J Clin Invest.* 2010;40(7):645-54.
55. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 1998;12(9):1260-8.
56. Abedin M, Omland T, Ueland T, Khera A, Aukrust P, Murphy SA, et al. Relation of osteoprotegerin to coronary calcium and aortic plaque (from the Dallas Heart Study). *Am J Cardiol.* 2007;99(4):513-8.
57. Reinhard H, Nybo M, Hansen PR, Wiinberg N, Kjaer A, Petersen CL, et al. Osteoprotegerin and coronary artery disease in type 2 diabetic patients with microalbuminuria. *Cardiovasc Diabetol.* 2011;10:70.
58. Nascimento MM, Hayashi SY, Riella MC, Lindholm B. Elevated levels of plasma osteoprotegerin are associated with all-cause mortality risk and atherosclerosis in patients with stages 3 to 5 chronic kidney disease. *Braz J Med Biol Res.* 2014;47(11):995-1002.
59. Kiani AN, Aukrust P, Ueland T, Hollan I, Barr E, Magder LS, et al. Serum osteoprotegerin (OPG) in subclinical atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2017;26(8):865-70.
60. Kim KI, Park KU, Chun EJ, Choi SI, Cho YS, Youn TJ, et al. A novel biomarker of coronary atherosclerosis: serum DKK1 concentration correlates with coronary artery calcification and atherosclerotic plaques. *J Korean Med Sci.* 2011;26(9):1178-84.
61. Motovska Z, Vichova T, Doktorova M, Labos M, Maly M, Widimsky P. Serum Dickkopf-1 signaling and calcium deposition in aortic valve are significantly related to the presence of concomitant coronary atherosclerosis in patients with symptomatic calcified aortic stenosis. *J Transl Med.* 2015;13:63.

Table 1. Patient's clinical and laboratorial characteristics according to coronary calcium score value.

	Value		
Characteristic	Total sample	CCS ≤ 10	CCS >10
Patient related	N= 78	N= 50	N= 28
Female, n (%)	60 (76.9)	41 (82.0)	19 (67.9)
Postmenopausal, n (%)	38 (63.3)	30 (73.1)	18 (64.3)
Time since menopause, mean (SD), years	8.480 (8.572)	6.100 (7.778)	13.630 (8.091)
Male, n (%)	18 (23.1)	9 (18.0)	9 (32.1)
Age, mean (SD), years	53.400 (11.137)	50.560 (11.165)	58.460 (9.272)
BMI, mean (SD), kg/m ²	26.442 (4.023)	27.097 (4.368)	25.229 (3.000)
< 25	31 (40.3)	15 (30.0)	17 (60.7)
25 ≤ BMI < 30	32 (41.6)	22 (44.0)	10 (35.7)
≥ 30	15 (19.2)	13 (26.0)	1 (3.6)
Ever smokers, n (%)	9 (11.5)	7 (14.0)	2 (7.1)
Hypertension, n (%)	14 (17.9)	7 (14.0)	7 (25.0)
Diabetes mellitus, n (%)	7 (9.0)	1 (2.0)	6 (21.4)
Dyslipidemia, n (%)	11 (14.1)	6 (12.0)	5 (17.9)
Disease related			

Diagnosis age, mean (SD), years	39.350 (12.456)	37.960 (11.942)	41.820 (13.183)
Disease duration, mean (SD), years	14.060 (9.891)	12.620 (9.806)	16.640 (9.681)
RF, mean (SD), U/mL	167.085 (316.78)	211.866 (368.57)	87.118 (171.224)
RF positivity (> 30 U/mL), n (%)	45 (57.7)	32 (64.0)	13 (46.4)
ACPA, mean (SD), U/mL	455.439 (918.85)	452.636 (898.11)	460.443 (971.547)
ACPA positivity (> 7 U/mL), n (%)	59 (75.6)	38 (76.0)	21 (75.0)
Extra-articular manifestations, n (%)	30 (38.5)	18 (36.0)	12 (42.9)
DAS28 (4V), mean (SD)	4.359 (1.309)	4.092 (1.198)	4.836 (1.383)
DAS28 (3V), mean (SD)	4.129 (1.240)	3.881 (1.138)	4.573 (1.309)
DAS28 (4v; CRP), mean (SD)	3.867 (1.318)	3.604 (1.268)	4.337 (1.296)
DAS28 (3v; CRP), mean (SD)	3.594 (1.270)	3.344 (1.230)	4.040 (1.238)
Disease activity – DAS28 (4V)			
Low (DAS28(4v) ≤ 3.2)	18 (23.1)	14 (28.0)	4 (14.3)
Moderate (3.2 < DAS28(4v) ≤ 5.1)	38 (48.7)	16 (52.0)	12 (42.9)
High (DAS28(4v) > 5.1)	22 (28.2)	10 (20.0)	12 (42.9)
TJC (out of 68), mean (SD)	11.897 (11.335)	11.880 (11.188)	13.714 (11.572)
SJC (out of 66), mean (SD)	5.500 (5.446)	4.960 (5.792)	6.464 (4.710)
ESR, mean (SD), mm (first hour)	26.130 (19.005)	23.120 (17.925)	31.500 (20.008)
CRP, mean (SD), mg/L	11.981 (19.353)	7.408 (9.509)	20.146 (28.216)
HAQ score, mean (SD)	1.375 (0.664)	1.293 (0.658)	1.522 (0.660)
HAQ ≤ 0.5, n (%)	11 (14.1)	8 (16.0)	3 (10.7)
Erosion score, mean (SD)	65.676 (50.063)	54.587 (43.596)	83.893 (55.271)
Joint space narrowing score, mean (SD)	83.297 (32.741)	80.630 (33.428)	87.679 (31.683)
Total SHS, mean (SD)	148.973 (77.088)	135.217 (71.446)	171.571 (81.898)
Proximal femur bmd, mean (SD),	0.938 (0.158)	0.972 (0.155)	0.873 (0.145)

g/cm ²			
Lumbar spine bmd, mean (SD), g/cm ²	1.082 (0.181)	1.127 (0.177)	1.002 (0.162)
Left hand bmd, mean (SD), g/cm ²	0.388 (0.070)	0.400 (0.068)	0.364 (0.069)
WHO classification			
Normal	33 (42.3)	25 (50.0)	8 (28.6)
Osteopenia	29 (37.2)	19 (38.0)	10 (35.7)
Osteoporosis	16 (20.5)	6 (12.0)	10 (35.7)
RA related treatment			
Symptomatic			
Corticosteroids, n (%)	64 (82.1)	42 (84.0)	22 (78.6)
Daily dose in prednisolone equivalents, mean (±SD), mg	5.974 (4.417)	6.385 (4.674)	5.241 (3.888)
Time under corticosteroids, mean (±SD), years	11.833 (8.871)	10.640 (8.027)	13.964 (10.005)
NSAIDs, n (%)	57 (73.1)	35 (70.0)	22 (78.6)
DMARDs, n (%)	58 (74.4)	36 (72.0)	14 (50.0)
Cumulative, mean (SD)	2.782 (1.429)	2.580 (1.527)	3.143 (1.177)
Time under DMARDs, mean (SD), months	104.299 (89.177)	100.82 (88.331)	110.741 (92.063)
Methotrexate, n (%)	48 (61.5)	33 (66.0)	15 (53.6)
Leflunomide, n (%)	17 (21.8)	10 (20.0)	7 (25.0)
Hydroxychloroquine, n (%)	3 (3.8)	2 (4.0)	1 (3.6)
Sulfasalazine, n (%)	3 (3.8)	2 (4.0)	1 (3.6)
Cyclosporine, n (%)	1 (1.3)	0 (0.0)	1 (3.6)
Azathioprine, n (%)	2 (2.6)	1 (2.0)	1 (3.6)

Biologic DMARDs, n (%)	42 (53.8)	28 (56.0)	14 (50.0)
Monotherapy, n (%)	20 (25.6)	14 (28.5)	6 (21.4)
Time under biologics, mean (SD), months	31.091 (36.079)	31.286 (36.636)	30.750 (35.745)
Adalimumab, n (%)	8 (10.3)	8 (10.3)	2 (7.1)
Etanercept, n (%)	19 (24.4)	19 (24.4)	4 (14.3)
Infliximab, n (%)	6 (7.7)	6 (7.7)	3 (10.7)
Rituximab, n (%)	7 (9.0)	7 (9.0)	4 (14.3)
Anakinra, n (%)	1 (1.3)	1 (1.3)	1 (3.6)
Tocilizumab, n (%)	1 (1.3)	1 (1.3)	0 (0.0)
Bisphosphonates, n (%)	28 (35.9)	16 (32.0)	12 (42.9)
Time under bisphosphonates, mean (SD), months	19.731 (32.580)	17.760 (31.143)	23.250 (35.311)
Vitamin D supplements, n (%)	15 (19.2)	8 (16.0)	7 (25.0)
Folic acid supplements, n (%)	41 (52.6)	28 (56.0)	13 (46.4)
Cardiovascular related treatment			
Anti-agregants, n (%)	7 (9.0)	2 (4.0)	5 (17.9)
ACEIs, n (%)	11 (14.1)	6 (12.0)	5 (17.9)
ARAs, n (%)	10 (12.8)	6 (12.0)	4 (14.3)
CCAs, n (%)	5 (6.4)	3 (6.0)	2 (7.1)
BBs, n (%)	6 (7.7)	4 (8.0)	2 (7.1)
Nitrates, n (%)	1 (1.3)	0 (0.0)	1 (3.6)
Diuretics, n (%)	16 (20.5)	10 (20.0)	6 (21.4)
Digoxin, n (%)	1 (1.3)	0 (0.0)	1 (3.6)
Amiodarone, n (%)	1 (1.3)	0 (0.0)	1 (3.6)
Warfarin, n (%)	1 (1.3)	0 (0.0)	1 (3.6)

Statins, n (%)	17 (21.8)	7 (14.0)	10 (35.7)
Oral anti-diabetic agents, n (%)	7 (9.0)	1 (2.0)	6 (21.4)
Insulin, n (%)	1 (1.3)	1 (2.0)	0 (0.0)
Serum traditional cardiovascular biomarkers			
BNP, mean (SD), pg/mL	41.059 (42.533)	34.002 (32.950)	53.661 (54.148)
>100	4 (5.1)	1 (2.0)	3 (10.7)
Glicemia, mean (SD), g/L	83.436 (24.877)	81.080 (11.925)	87.643 (38.447)
>1.15	5 (6.4)	0 (0)	5 (17.9)
Uric acid, mean (SD), mg/L	41.913 (15.466)	39.810 (12.587)	45.668 (19.282)
>61	8 (10.3)	4 (8.0)	4 (14.3)
TC, mean (SD), mg/dL	213.670 (34.702)	215.140 (33.839)	211.040 (36.675)
>200	47 (60.3)	30 (60.0)	17 (60.7)
HDL, mean (SD), mg/dL	58.100 (16.331)	61.580 (17.230)	51.890 (12.627)
<60	47 (60.3)	25 (50.0)	22 (78.6)
LDL, mean (SD), mg/dL	133.580 (27.338)	131.840 (26.168)	136.680 (29.550)
>130	40 (51.3)	24 (48.0)	16 (57.1)
TGs, mean (SD), mg/dL	118.960 (52.754)	114.820 (51.710)	126.360 (54.730)
>150	13 (16.7)	7 (14.0)	6 (21.4)
ApoA1, mean (SD), mg/dL	148.077 (28.010)	154.540 (30.207)	136.536 (19.130)
<73	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ApoB, mean (SD), mg/dL	102.769 (20.961)	100.380 (19.568)	107.036 (22.992)
>138	3 (3.8)	1 (2.0)	2 (7.1)
Lp(a), mean (SD), mg/dL	21.632 (25.331)	19.546 (21.303)	25.357 (31.367)
>30	20 (25.6)	12 (24.0)	8 (28.6)
TC/HDL ratio, mean (SD)	3.918 (1.087)	3.741 (1.108)	4.235 (0.989)

>4.5	22 (28.2)	12 (24.0)	10 (35.7)
LDL/HDL ratio, mean (SD)	2.494 (0.872)	2.343 (0.886)	2.763 (0.792)
>3.0	22 (28.2)	10 (20.0)	12 (42.9)
ApoB/ApoA1 ratio, mean (SD)	0.719 (0.198)	0.675 (0.187)	0.797 (0.194)
>0.9	16 (20.5)	7 (14.0)	7 (25.0)
Insuline , mean (SD), μ U/l	10.844 (9.700)	11.210 (9.213)	10.170 (10.704)
HOMA insuline resistance, mean (SD)	2.364 (2.582)	2.348 (2.373)	2.394 (2.979)
<3	63 (80.8)	41 (82.0)	22 (78.6)
≥ 3 and <5	12 (15.4)	7 (14.0)	5 (17.9)
≥ 5	3 (3.8)	2 (4.0)	1 (3.6)
Homocystein, mean (SD), μ mol/L	10.441 (3.312)	9.826 (3.385)	11.539 (2.923)
>12.44	15 (19.2)	7 (14.0)	8 (28.9)
Folic acid, mean (SD), ng/mL	9.297 (4.803)	8.798 (4.814)	10.189 (4.737)
<2.2	1 (1.3)	0 (0)	1 (3.6)
Creatinine, mean (SD), mg/L	8.877 (2.475)	8.670 (2.315)	9.246 (2.744)
>10	16 (20.5)	9 (18.0)	7 (25.0)
Serum non-traditional cardiovascular biomarkers			
25(OH) vitaminD3, mean (SD), ng/mL	25.182 (15.408)	22.776 (13.155)	29.393 (18.213)
<15	14 (17.9)	13 (26.0)	1 (3.6)
$15 \leq 25(\text{OH})$ vitaminD3 <30	36 (46.2)	24 (48.0)	11 (39.3)
≥ 30	28 (35.9)	12 (24.0)	16 (57.1)
Beta-CTX, mean (SD), ng/mL	0.298 (0.185)	0.297 (0.189)	0.299 (0.181)
Osteocalcin, mean (SD), ng/mL	16.510 (8.127)	16.736 (8.256)	16.107 (8.026)
Intact PTH, mean (SD), pg/mL	44.572 (17.385)	44.902 (15.977)	43.982 (19.951)
>65	11 (14.1)	8 (16.0)	3 (10.7)

Dkk1, mean (SD), pmol/L	90.889 (43.663)	81.762 (41.647)	107.186 (43.122)
Sclerostin, mean (SD), ng/mL	0.234 (0.100)	0.225 (0.100)	0.250 (0.100)
OPG, mean (SD), pmol/L	3.419 (1.679)	3.106 (1.620)	3.979 (1.664)
RANKL, mean (SD), pmol/L	4061.958 (2129.340)	3779.375 (2309.923)	4543.396 (1714.356)
OPG/RANKL ratio, mean (SD)	0.00114 (0.00146)	0.00120 (0.00178)	0.00105 (0.00066)

ACEIs, angiotensin converter enzyme inhibitors; ACPA, anti-citrullinated protein antibodies; ApoA1, Apolipoprotein A1; ApoB, Apolipoprotein B; ARAs, angiotensin receptor antagonists; BBs, Beta-blockers; beta-CTX, beta-carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen; bmd, bone mineral density; BMI, Body Mass Index; BNP, B-type natriuretic peptide; CCAs, calcium channel antagonists; CCS, coronary calcium score; CI, confidence interval; CRP, C reactive protein; DAS, disease activity score; Dkk-1, dickkopf-1; DMARDs, disease-modifying antirheumatic drugs; ESR, erythrocyte sedimentation rate; HAQ, health assessment questionnaire; HOMA, Homeostasis model assessment; HDL, High density lipoprotein; LDL, Low density lipoprotein; Lp(a), Lipoprotein (a); NSAIDs, nonsteroidal anti-inflammatory drugs; OPG, Osteoprotegerin; OR, Odds ratio; PTH, Parathormone; RANKL, receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand; RF, Rheumatoid factor; SD, standard deviation; SHS, Sharp/van der Heijde Score; SJC, swollen joint count; TC, Total Cholesterol; TGs, Triglycerides; TJC, tender joint count; WHO, World Health Organization.

Table 2. Distribution of Coronary Calcium Score parameters according to the coronary anatomy.

Coronary arteries	Without lesions, patients (%)	Number of lesions (SD)	Lesions volume, mm ³ (SD)	Calcium mass, CaHA mg (SD)	Agatston score, unit (SD)
Left main	75 (96)	0.039 (0.194)	2.649 (19.441)	0.642 (5.031)	2.933 (22.852)
Left anterior descending	46 (59)	0.910 (1.470)	26.947 (70.141)	5.672 (16.584)	29.247 (83.660)
Left circumflex	63 (81)	0.359 (0.911)	6.312 (19.229)	1.077 (3.354)	5.767 (18.672)
Right coronary artery	58 (74)	0.487 (1.041)	8.542 (25.454)	1.570 (4.892)	8.190 (25.970)
Total coronary bed	37 (47)	1.808 (3.075)	44.441 (106.475)	8.961 (24.572)	46.133 (122.892)

SD, standard deviation; CaHA, calcium hydroxylapatite.

Table 3. Crude and adjusted Odds ratios for the associations between rheumatoid arthritis patients' clinical and laboratory variables with the presence of a coronary calcium score >10.

	OR (95% CI) p value	Adjusted OR * (95% CI) p value	Adjusted OR † (95% CI) p value
Male sex (versus female)	2.158 (0.739-6.305) 0.160	-	-
Age (per year)	1.076 (1.023-1.132) 0.004	-	-
BMI (per Kg/m ²)	0.882 (0.776-1.003) 0.056	0.832 (0.711-0.974) 0.023	-
<25	Reference	Reference	
≥ 25 and < 30	0.426 (0.153-1.190) 0.104	0.303 (0.093-0.992) 0.048	
≥30	0.072 (0.008-0.621)	0.026 (0.002-0.404)	

	0.017	0.009	
Disease duration (per year)	1.043 (0.993-1.094) 0.092	-	-
Time under biological (per month)	0.999 (0.986-1.013) 0.950	-	-
DAS28 (4v) (per unit)	1.584 (1.077-2.330) 0.019	1.764 (1.135-2.743) 0.012	1.896 (1.202-2.991) 0.006
DAS28 (4v; CRP) (per unit)	1.558 (1.067-2.275) 0.022	1.685 (1.102-2.576) 0.016	1.831 (1.177-2.849) 0.007
DAS28 (3v) (per unit)	1.610 (1.072-2.419) 0.022	-	-
DAS28 (3v; CRP) (per unit)	1.569 (1.062-2.319) 0.024	-	-
TJC (in 68 joints) (per unit)	1.022 (0.981-1.064) 0.292	-	-
SJC (in 66 joints) (per unit)	1.051 (0.966-1.145) 0.248	-	-
HAQ (per unit)	1.717	-	-

	(0.831-3.552)		
	0.145		
ESR (per mm)	1.024	-	-
	(0.998-1.051)		
	0.074		
CRP (per mg/L)	1.046	1.053	1.050
	(1.006-1.086)	(1.013-1.093)	(1.009-1.093)
	0.022	0.008	0.016
BNP (per pg/mL)	1.011	-	-
	(0.999-1.024)		
	0.072		
RF (per UI/mL)	0.998	-	-
	(0.995-1.001)		
	0.128		
ACPA (per U/mL)	1.000	-	-
	(0.999-1.001)		
	0.971		
Insuline (per µU/L)	0.988	-	-
	(0.934-1.045)		
	0.667		
Glucose (per g/L)	1.010	-	-
	(0.992-1.030)		
	0.280		
HOMA insuline resistance (per unit)	1.007	-	-
	(0.834-1.215)		
	0.942		

TC/ HDL (per unit)	1.533 (0.984-2.387) 0.059	-	-
LDL/ HDL (per unit)	1.767 (1.014-3.079) 0.045	1.760 (0.944-3.282) 0.075	1.825 (0.936-3.558) 0.077
Apo B/ Apo A1 (per unit)	28.657 (2.134-384.88) 0.011	37.939 (1.857-775.09) 0.018	39.465 (1.655-940.84) 0.023
TC (per mg/dL)	0.705 (0.181-2.749) 0.615	-	-
LDL (per mg/dL)	1.920 (0.350-10.523) 0.452	-	-
HDL (per mg/dL)	0.016 (0.001-0.446) 0.015	0.245 (0.0006-0.945) 0.047	0.027 (0.0005-1.410) 0.073
TGs (per mg/dL)	1.508 (0.631-3.601) 0.356	-	-
Apo A1 (per mg/dL)	0.970 (0.949-0.993) 0.009	0.967 (0.941-0.994) 0.016	0.967 (0.939-0.995) 0.023
Apo B (per mg/dL)	1.015 (0.993-1.039)	-	-

	0.183		
Lp(a) (per mg/dL)	1.009 (0.991-1.027) 0.336	-	-
Uric acid (per mg/L)	1.025 (0.994-1.057) 0.116	-	-
Creatinine (per mg/L)	1.097 (0.910-1.323) 0.331	-	-
Homocistein (per µmol/L)	1.176 (1.009-1.371) 0.038	1.091 (0.921-1.293) 0.312	1.166 (0.971-1.402) 0.101
25(OH)vitamin D (per ng/mL)	1.031 (0.995-1.068) 0.098	-	-
Beta-CTX (per ng/mL)	1.052 (0.083-13.268) 0.969	-	-
Osteocalcine (per ng/mL)	0.990 (0.935-1.043) 0.742	-	-
Intact PTH (per pg/mL)	0.997 (0.970-1.024) 0.822	-	-
Dkk-1 (per pmol/L)	1.014	1.013	1.013

	(1.002-1.025)	(1.000-1.025)	(1.000-1.026)
	0.017	0.042	0.048
Sclerostin (per ng/mL)	10.993 (0.085- 1429.893) 0.334	-	-
OPG/ RANKL ratio (per unit)	1.25×10^{-36} (6.8×10^{-203} -2.3×10^{-130}) 0.672	-	-
OPG (per pmol/L)	1.381 (1.029-1.853) 0.031	1.374 (0.985-1.916) 0.061	1.354 (0.961-1.907) 0.083
RANKL (per pmol/L)	1.000 (0.999-1.000) 0.145	-	-
Prednisolone (mg a day) (per unit)	0.939 (0.840-1.051) 0.274	-	-
Corticosteroid therapy duration (per year)	1.044 (0.990-1.100) 0.115	-	-
Cumulative number of DMARDs (per unit)	1.323 (0.950-1.844) 0.098	-	-
Time under DMARDs (per month)	1.001	-	-

	(0.996-1.006)		
	0.640		
Bisphosphonates use (ever versus never)	1.594 (0.613-4.144) 0.339	-	-
Time under anti-osteoporotic drugs (per month)	1.005 (0.991-1.019) 0.476	-	-
ACEIs use (current versus not current)	1.594 (0.439-5.789) 0.478	-	-
ARA II use (current versus not current)	1.222 (0.314-4.759) 0.772	-	-
CCAs use (current versus not current)	1.205 (0.189-7.681) 0.843	-	-
BBs use (current versus not current)	0.885 (0.152-5.163) 0.892	-	-
Diuretics use (current versus not current)	1.091 (0.350-3.404) 0.881	-	-
Statins use (current versus not current)	3.413 (1.124-10.372) 0.030	2.626 (0.787-8.759) 0.116	4.418 (1.114-17.526) 0.035

Anti-diabetic therapy (current versus not current)	13.364 (1.517-117.74) 0.020	7.534 (0.804-70.584) 0.077	7.965 (0.776-81.773) 0.081
Proximal femur bmd (per g/cm ²)	0.012 (0.0003-0.411) 0.014	0.012 (0.0002-0.774) 0.037	0.022 (0.0003-1.495) 0.076
Lumbar spine bmd (per g/cm ²)	0.009 (0.0003-0.266) 0.006	0.022 (0.0005-0.928) 0.046	0.046 (0.001-2.189) 0.118
Left hand bmd (per g/cm ²)	0.0004 (1.45x10 ⁻⁷ -1.122) 0.053	0.0009 (2.84x10 ⁻⁸ -29.813) 0.187	0.0038 (1.07x10 ⁻⁷ -133.470) 0.296
Osteopenia (WHO classification)	1.729 (0.552-5.413) 0.347	-	-
Osteoporosis (WHO classification)	5.476 (1.464-20.483) 0.012	2.971 (0.705-12.509) 0.365	2.205 (0.482-10.094) 0.308
Diabetes mellitus	13.429 (1.520-118.63) 0.019	8.858 (0.922-85.068) 0.059	6.254 (0.645-60.661) 0.114
Arterial hypertension	2.050 (0.632-6.646) 0.232	-	-
Dyslipidemia	1.591	-	-

	(0.436-5.803)		
	0.482		
Joint space narrowing score (per unit)	1.007 (0.992-1.022) 0.368	-	-
Erosion score (per unit)	1.012 (1.002-1.023) 0.018	1.013 (1.002-1.025) 0.020	1.010 (0.998-1.022) 0.103
Total SHS (per unit)	1.006 (0.999-1.013) 0.053	1.007 (1.0001-1.015) 0.044	1.005 (0.998-1.013) 0.172

OR * adjusted for sex and age; OR† adjusted for sex, age and BMI;

ACEIs, angiotensin converter enzyme inhibitors; ACPA, anti-citrullinated protein antibodies; ApoA1, Apolipoprotein A1; ApoB, Apolipoprotein B; ARAs, angiotensin receptor antagonists; BBs, Beta-blockers; beta-CTX, beta-carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen; bmd, bone mineral density; BMI, Body Mass Index; BNP, B-type natriuretic peptide; CCAs, calcium channel antagonists; CI, confidence interval; CRP, C reactive protein; DAS, disease activity score; Dkk-1, dickkopf-1; DMARDs, disease-modifying antirheumatic drugs; ESR, erythrocyte sedimentation rate; HAQ, health assessment questionnaire; HOMA, Homeostasis model assessment; HDL, High density lipoprotein; LDL, Low density lipoprotein; Lp(a), Lipoprotein (a); NSAIDs, nonsteroidal anti-inflammatory drugs; OPG, Osteoprotegerin; OR, Odds ratio; PTH, Parathormone; RANKL, receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand; RF, Rheumatoid factor; SHS, Sharp/van der Heijde Score; SJC, swollen joint count; TC, Total Cholesterol; TGs, Triglycerides; TJC, tender joint count; WHO, World Health Organization.

3. Relativamente ao dano ósseo na artrite reumatoide

3.1. LRP5 gene polymorphisms and radiographic joint damage in rheumatoid arthritis patients

Bernardes M, Oliveira A, Martins MJ, Lucas R, Costa L, Pereira J, Ramos I, Machado JC, Simões-Ventura F. LRP5 gene polymorphisms and radiographic joint damage in Rheumatoid Arthritis patients.

(submetido à revista Osteoporos Int em novembro de 2017)

Osteoporosis International

LRP5 gene polymorphisms and radiographic joint damage in Rheumatoid Arthritis patients

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	OSIN-D-17-00996	
Full Title:	LRP5 gene polymorphisms and radiographic joint damage in Rheumatoid Arthritis patients	
Article Type:	Original Article	
Funding Information:	Associação Nacional de Reumatologia (not applicable)	Dr Miguel Bernardes
Abstract:	<p>Purpose: Rheumatoid arthritis (RA) is characterized by increased bone resorption and impaired bone formation. Osteoblast function is regulated by the canonical Wnt/β-catenin pathway, critically signaled by the lipoprotein receptor-related protein-5 (LRP5). Since bone mineral density (BMD) and RA joint destruction are partially inherited, we aimed to study their association with three LRP5 single nucleotide polymorphisms (SNPs).</p> <p>Methods: From 208 patients with RA, clinical data and peripheral blood samples for biomarkers assessment and LRP5 genotyping were collected. Hands and feet x-rays were scored [modified Sharp/van der Heijde Score (SHS)]. Lumbar spine, total left proximal femur and left hand BMD were assessed by Dual-energy X-ray absorptiometry (DXA).</p> <p>Results: The TT genotypes for p.A1330V and p.N740N LRP5 SNPs were associated with total SHS, erosion score and hands erosion score. Additionally, an association was found with hands total score and feet joint space narrowing (JSN) for those SNPs, respectively; all associations were independent of age at RA diagnosis and Health Assessment Questionnaire (HAQ) index. The AG genotype for p.V667M LRP5 SNP was associated with hands JSN score, independently of age at RA diagnosis and HAQ, and with sclerostin, independently of age at RA diagnosis, HAQ and osteoporosis treatment duration. The TC genotype for the p.N740N LRP5 SNP was associated with total left proximal femur BMD, independently of age at RA diagnosis, HAQ, BMI, and osteoporosis treatment duration.</p> <p>Conclusion: In summary, we found significant associations between LRP5 SNPs (p.A1330V, p.N740N and p.V667M) and the severity of radiographic damage, reinforcing the evidence of bone destruction heritability in RA.</p>	
Corresponding Author:	Miguel Bernardes, M.D. Department of Rheumatology, São João Hospital Centre; Department of Medicine, Faculty of Medicine, University of Porto, Porto, Portugal Porto, PORTUGAL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Department of Rheumatology, São João Hospital Centre; Department of Medicine, Faculty of Medicine, University of Porto, Porto, Portugal	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Miguel Bernardes, M.D.	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Miguel Bernardes, M.D. Ana Oliveira, M.D. Maria João Martins, M.Sc, Ph.D Raquel Lucas, M.Sc, Ph.D Lúcia Costa, M.D. Jorge G. Pereira, M.D. Isabel Ramos, M.D., Ph.D	

Powered by Editorial Manager® and Production Manager® from Aries Systems Corporation

	José Carlos Machado, M.Sc, Ph.D
	Francisco Simões-Ventura, M.D., Ph.D
Order of Authors Secondary Information:	
Author Comments:	<p>Dear Co-Editors-in-Chief of Osteoporosis International,</p> <p>We would like to submit the manuscript entitled "LRP5 gene polymorphisms and radiographic joint damage in Rheumatoid Arthritis patients" as an original article. The choice for your scientific journal was dictated by the strong emphasis on publications in the field of bone metabolism and bone molecular biology in metabolic and in chronic inflammatory rheumatic diseases.</p> <p>Rheumatoid arthritis (RA) is characterized by increased bone resorption and impaired bone formation. Moreover, osteoblast function is regulated by the canonical LRP5/Wnt/β-catenin pathway. Since bone mineral density (BMD) and RA joint destruction are partially inherited, we aimed to study their association with three LRP5 SNPs. From 208 RA patients, clinical parameters, serum biomarkers and LRP5 genotyping were assessed. Hands and feet x-rays were scored [modified Sharp/van der Heijde Score (SHS)]. Lumbar, femoral and hand BMD were assessed by DXA. We have obtained very interesting results. The TT genotypes for p.A1330V and p.N740N LRP5 SNPs were associated with total SHS, erosion score and hands erosion score. They were also associated with hands total score and feet joint space narrowing (JSN), respectively; all independent of age at RA diagnosis and Health Assessment Questionnaire (HAQ) index. The AG genotype for p.V667M LRP5 SNP was associated with hands JSN score and sclerostin, independently of age at RA diagnosis and HAQ (the second also independent of osteoporosis treatment duration). The TC genotype for the p.N740N LRP5 SNP was associated with total left proximal femur BMD, independently of age at RA diagnosis, HAQ, BMI, and osteoporosis treatment duration. In conclusion, we found significant associations between LRP5 SNPs (p.A1330V, p.N740N and p.V667M) and the severity of radiographic damage, reinforcing the evidence of bone destruction heritability in RA. To our knowledge, this is the second cohort candidate gene study to do so. Our results are of some importance at this time, in which new therapies for the bone emerge, targeting precisely the Wnt/β-catenin pathway.</p> <p>The manuscript has not been published and is not under consideration to be published elsewhere; also has not been published or posted on the Internet. Some data included/mentioned in the manuscript under submission have been published in the form of abstracts.</p> <p>All authors participated in the conception and revision of the manuscript and all revised and approved the submission to Osteoporosis International.</p> <p>We declare that there is no relationship with industry or financial associations that might pose a conflict of interest in connection with the submitted article.</p> <p>We sincerely hope that there is a chance for this study of being accepted for publishing in Osteoporosis International after peer-review.</p> <p>Best regards, Miguel Bernardes, MD</p> <p>Department of Rheumatology, São João Hospital Centre Avenida Prof. Hernani Monteiro, 4200-319 Porto, Portugal Fax: (+351) 225512393; Phone: (+ 351) 93 4205538 E-mail: mbernardes09@gmail.com</p>
Suggested Reviewers:	<p>João Eurico Fonseca, M.D., Ph.D Full Professor of Medicine, Faculty of Medicine, University of Lisbon jecfonseca@gmail.com A lot of work in the field of osteoimmunology.</p> <p>Rui Medeiros, B.Sc, M.Sc, Ph.D Ghest Associate Professor, Biomedical Science Institute, University of Porto ruimedei@ipoporto.min-saude.pt A lot of experience with SNPs analysis</p>

*Original Article***LRP5 gene polymorphisms and radiographic joint damage in Rheumatoid Arthritis patients****Authors**

1. Bernardes, Miguel; MD, MSc [✉]

Department of Rheumatology, São João Hospital Centre, Porto, Portugal;

Department of Medicine, Faculty of Medicine, University of Porto, Porto, Portugal;

mbernardes09@gmail.com

[✉]Alameda Prof. Hernâni Monteiro, 4200-319 Porto, Portugal; Phone: +351933268170

ORCID ID: orcid.org/0000-0002-1849-5465

2. Oliveira, Ana; MD

Department of Nuclear Medicine, São João Hospital Centre, Porto, Portugal

anacoliveira@gmail.com

3. Martins, Maria João; MSc, PhD

Unit of Biochemistry, Department of Biomedicine, Faculty of Medicine of University of Porto, Porto, Portugal;

Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (i3s), University of Porto, Porto, Portugal

mmartins@med.up.pt

4. Lucas, Raquel; MSc, PhD

EPIUnit-Institute of Public Health, University of Porto, Porto, Portugal;

1 Department of Clinical Epidemiology, Predictive Medicine and Public Health, Faculty of Medicine,
 2 University of Porto, Porto, Portugal
 3
 4 rlucas@med.up.pt
 5
 6
 7
 8
 9
 10 5. Costa, Lúcia; MD
 11
 12 Department of Rheumatology, São João Hospital Centre, Porto, Portugal
 13
 14
 15 dias.costa.ml@gmail.com
 16
 17
 18
 19
 20
 21 6. G. Pereira, Jorge; MD
 22
 23 Department of Nuclear Medicine, São João Hospital Centre, Porto, Portugal
 24
 25
 26 jorgegppereira@gmail.com
 27
 28
 29
 30
 31
 32 7. Ramos, Isabel; MD, PhD
 33
 34 Department of Radiology, São João Hospital Centre, Porto, Portugal;
 35
 36 Department of Medicine, Faculty of Medicine, University of Porto, Porto, Portugal
 37
 38
 39 radiologia.hsj@gmail.com
 40
 41
 42
 43
 44
 45 8. Machado, José Carlos; MSc, PhD
 46
 47 Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of Porto, Porto, Portugal;
 48
 49 Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto (IPATIMUP), Porto, Portugal
 50
 51
 52 joseclm@gmail.com
 53
 54
 55
 56
 57
 58
 59 9. Simões-Ventura, Francisco; MD, PhD
 60
 61
 62
 63
 64
 65

Faculty of Medicine of University of Porto (FMUP), Porto, Portugal

fsventura@zonmail.pt

MINI ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is characterized by increased bone resorption and impaired bone formation. Osteoblast function is regulated by the canonical LRP5/Wnt/ β -catenin pathway. Bone mineral density and RA joint destruction are partially inherited. In line with this, we found significant associations between LRP5 SNPs (p.A1330V, p.N740N, p.V667M) and RA radiographic damage severity.

ABSTRACT

Purpose: Rheumatoid arthritis (RA) is characterized by increased bone resorption and impaired bone formation. Osteoblast function is regulated by the canonical Wnt/ β -catenin pathway, critically signaled by the lipoprotein receptor-related protein-5 (LRP5). Since bone mineral density (BMD) and RA joint destruction are partially inherited, we aimed to study their association with three LRP5 single nucleotide polymorphisms (SNPs).

Methods: From 208 patients with RA, clinical data and peripheral blood samples for biomarkers assessment and LRP5 genotyping were collected. Hands and feet x-rays were scored [modified Sharp/van der Heijde Score (SHS)]. Lumbar spine, total left proximal femur and left hand BMD were assessed by Dual-energy X-ray absorptiometry (DXA).

Results: The TT genotypes for p.A1330V and p.N740N LRP5 SNPs were associated with total SHS, erosion score and hands erosion score. Additionally, an association was found with hands total score and feet joint space narrowing (JSN) for those SNPs, respectively; all associations were independent of age at RA diagnosis and Health Assessment Questionnaire (HAQ) index. The AG genotype for p.V667M LRP5 SNP was associated with hands JSN score, independently of age at RA diagnosis and HAQ, and with sclerostin, independently of age at RA diagnosis, HAQ and osteoporosis treatment duration. The TC genotype for the p.N740N LRP5 SNP was associated with total left proximal femur BMD, independently of age at RA diagnosis, HAQ, BMI, and osteoporosis treatment duration.

Conclusion: In summary, we found significant associations between LRP5 SNPs (p.A1330V, p.N740N and p.V667M) and the severity of radiographic damage, reinforcing the evidence of bone destruction heritability in RA.

KEYWORDS: LRP5, Rheumatoid arthritis, modified Sharp/van der Heijde Score, bone mineral density, DXA, sclerostin.

INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is the prototype of inflammatory arthritis. It is characterized by an increase in bone resorption and impairment of bone formation. This imbalanced bone remodeling occurs both in the subchondral and periarticular bone of joints - causing erosions and periarticular osteopenia -, and in the axial and appendicular skeleton - resulting in generalized bone loss (1). Radiographically, three forms of altered skeletal remodeling arise: a) bone erosions characteristic of RA at joint margins, where the bone is directly exposed to synovitis; b) periarticular osteopenia due to the effects of cytokines and other factors expressed in neighboring joints; and c) systemic osteopenia (axial and appendicular) due to the effects of inflammatory and other mediators produced by distant inflamed synovium (2, 3).

Osteoclasts play a determinant role in joint bone resorption in RA (2). Tumor necrosis factor alpha (TNF α) and interleukins (IL) 1 and 17 (major cytokines in RA) promote the differentiation of osteoclast precursors to osteoclasts (2, 4), namely through the upregulation of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) in osteoblasts. Also in RA patients, high titers of anti-citrullinated protein antibodies (ACPAs) are associated with radiographic progression, what in combination with rheumatoid factor (RF), has an additive effect on erosion size and erosions number (2). Additionally, ACPAs have been shown to promote inflammatory-mediated as well as inflammatory-independent bone loss in RA (2, 5). ACPAs bind to citrullinated vimentin on the surface of osteoclast precursors, inducing these precursors to produce TNF α and, thus, promoting their differentiation into mature osteoclasts (6). These findings are further supported by the occurrence of bone loss in ACPAs-positive healthy individuals, with no signs of synovitis, when compared to ACPAs-negative individuals, as observed in a Micro-Computed Tomography (Micro-CT)

analysis of the metacarpophalangeal joints (7). At this pre-clinical phase, in ACPAs-positive individuals, there is also no evidence of bone erosion. Since ACPAs can be detected in serum years before the onset of RA (8), it can be stated that bone damage seems to precede clinical onset of RA through mechanisms independent of inflammation.

Inhibition of osteoclast activity in RA patients, either with the bisphosphonate zoledronic acid or with the anti-RANKL monoclonal antibody denosumab, has some efficacy in inhibiting the progression of bone erosion (9, 10). Furthermore, zoledronic acid reduces the development of new bone erosions in arthritic mice joints (11) and denosumab attenuates loss of hand and systemic bone mineral density (BMD) in RA patients (9, 10). Therapies that reduce joint inflammation, as the disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs), can slow or halt the progression of osteoclast-mediated bone resorption in patients with RA. However, repair of existing erosions is unusual (12), even in clinically well-controlled RA patients. In fact, osteoblast-mediated bone formation is inhibited in the RA joint, impairing the repair of erosions. Recently, the Wnt signaling pathways have emerged as critical in the regulation of osteoblast function, being implicated in bone loss in RA (2). Wnt signaling includes the canonical Wnt/ β -catenin pathway and two noncanonical pathways (13). In the canonical Wnt/ β -catenin pathway, secreted Wnts, such as Wnt1 and Wnt3a, bind and activate a complex in the plasma membrane that includes the low-density lipoprotein receptor-related proteins (LRP) 5 and 6, promoting cytosolic β -catenin stabilization and, lastly, allowing its translocation to the nucleus to induce transcription of genes that promote osteoblast differentiation and bone formation. Antagonists to the Wnt pathway include dickkopf-1 (DKK-1) and sclerostin. DKK-1, not exclusively expressed by osteocytes, crosslinks LRP5/6 and suppresses Wnt signaling in osteoblast precursors. Curiously, its production is increased in the inflamed synovium, inhibiting osteoblast-mediated bone formation in arthritic joints (14). Sclerostin, a glycoprotein-secreted predominantly, if not exclusively, by osteocytes, also inhibits the canonical Wnt signaling pathway in osteoblast precursors by binding to LRP5/6 (15). In RA, circulating levels of DKK-1 may be raised (14) and have been related to radiographic joint damage. Diarra and colleagues recently demonstrated that TNF α is a key inducer of DKK-1 and that blocking DKK-1 in a mouse model leads to reversal of bone destruction. Moreover, the expression of sclerostin seems to be positively correlated with DKK-1 levels (16). Recently, it has been suggested that LRP5 regulates bone mass in part by modulating the circulating levels of serotonin (17) and that increased serum serotonin levels have negative effects on bone, as our group has recently shown for total left proximal femur BMD in postmenopausal RA women (17).

In RA, disease severity is often measured by the progression of joint destruction. Known risk factors, mainly relate to inflammation and autoantibodies (RF and ACPAs), are estimated to explain 32% of the variance in joint destruction (18). On the other hand, heritability of joint destruction rate amounts to 58% (19). Thus, the identification of individual genetic risk factors may help clarifying distinct levels of joint destruction severity in similar clinical settings and may allow the establishment of new therapeutic targets. We hypothesized that genetic variants in the Wnt/ β -catenin pathway, namely in the LRP5 gene, are associated with bone damage and radiographic progression in RA patients. We performed a case-case candidate gene study to explore this issue.

PATIENTS AND METHODS

Rheumatoid arthritis patients

During a six-month period, RA patients, classified according to the American College of Rheumatology 1987 criteria, were consecutively included in the study protocol. Informed consent was obtained from each patient. The study protocol was approved by the São João Hospital Centre (Porto, Portugal) Ethical Committee in accordance with the principles of the 1964 Declaration of Helsinki (20).

To determine the RA disease state, all subjects underwent clinical assessment using the Portuguese version of the Stanford Health Assessment Questionnaire (HAQ) and the Disease Activity Score (DAS28) four variables (4v) (21), in a Rheumatology appointment. All past medication since admission to the outpatient clinic and ongoing medication were recorded. Smoking status (past and current) was registered and body mass index (BMI) calculated.

Laboratory measurements

Between 08:00 a.m. and 10:00 a.m., a fasting blood sample was collected to evaluate creatinine, homocysteine, C-reactive protein (CRP), erythrocyte sedimentation rate (ESR), RF and ACPAs, calcium, phosphorus, alkaline phosphatase, 25(OH) vitamin D3, folic acid, intact parathormone (PTH), osteocalcin, β -isomerised carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen (β -CTX), osteoprotegerin (OPG), RANKL, DKK-1, sclerostin and serotonin levels. Patients followed a dietary plan [restriction of the following: tea, coffee, chocolate, avocado, banana, tomatoes, plums, walnuts, eggplant, pineapple, citrus and food containing vanilla (namely candy from pastry shops)] and were asked not to take paracetamol or

any cough medicine for 48 hours before the day of the blood sampling. Serum samples were stored at –70°C for OPG, RANKL, DKK-1, sclerostin and serotonin measurements by ELISA. All the specimens were measured in duplicate, as previously described (17, 22), according to the manufacturer's instructions and then averaged.

Bone mineral density measurement

BMD at the total left proximal femur, lumbar spine (L1-L4) and left hand were measured using Dual-energy X-ray absorptiometry (DXA; LUNAR Expert, XL scanner), according to a standardized procedure for each site, as described previously (17).

Radiographic evaluation

Radiographs of the hands (with wrists and phalanges) and feet, obtained in the posterior-anterior view, were scored by one trained reader, blinded for patient clinical variables and treatment allocation. The modified Sharp/van der Heijde Score (SHS) was used for the scoring of joint space narrowing (JSN) and erosiveness on the radiographs (23).

Genotyping

DNA was extracted from peripheral blood through the MagNA Pure LC DNA Isolation Kit - Roche® automatic extraction device. The obtained DNA was then quantified using the spectrophotometric method (NanoDrop2000c). Primers were designed for 3 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 3 exonic regions in the LRP5 gene (reference cDNA and protein sequences NM_002335.3 and NP_002326.2, respectively): a) LRP5 p.V667M (rs4988321; c.1999G>A) polymorphism in exon 9, primer forward (Fwd) 5' GGAGCTGCTGAGTGACATGA3' and primer reverse (Rev) 5' CCTTTATGGGAAAACCTTGC 3'; b) LRP5 p.N740N (rs2306862; c.2220C>T) polymorphism in exon 10, primer Fwd 5' CTTTCCTCCTCACCTGCTG3' and primer Rev 5' CTTGTGTTACCTCGTATGAG3'; c) LRP5 p.A1330V (rs3736228; C>T) polymorphism in exon 18, primer Fwd 5' GACCAGAGCGACGAGGAG 3' and primer Rev 5' TCTGAAAACCTTTGCTTGCA 3'. The fragments were amplified by the polymerase chain reaction (PCR) using the QIAGEN Multiplex PCR Kit, according to the manufacturer's instructions. Amplification was assessed by running GelRed stained products on a 2% agarose gel. Enzymatic purification of the amplified products was performed by the ExoSAP-it method and the sequencing reaction

was then performed by the Sanger method, using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit according to the manufacturer's instructions. The cases were finally run in the Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer and the sequences analyzed by Mutation Surveyor® software.

Statistical analyses

Qualitative data are described as absolute counts and proportions and quantitative data as mean and standard deviation. Statistical significance of the differences in SHS, BMD and serum biomarkers between the several genotypes for each SNP was determined using one-way analysis of variance (ANOVA), Kruskal-Wallis or Mann-Whitney U tests. These differences were obtained between the three possible genotypes (whenever achievable) and between the major allele homozygous genotype and the heterozygous genotype. The magnitude of these genotype-phenotype associations was also estimated from linear regression coefficients and respective 95% confidence intervals. In order to reduce confounding, genotypic associations were determined, with the following respective adjustments: age at RA diagnosis and HAQ for SHS outcomes; BMI, osteoporosis treatment duration, age at RA diagnosis and HAQ for BMD outcomes; osteoporosis treatment duration, age at RA diagnosis and HAQ for serum biomarkers outcomes. All analyses were two-sided and p values ≤ 0.05 were considered statistically significant. Statistical analyses were performed using STATA software V.11 (Statacorp, College Station, Texas, USA).

RESULTS

Patients' characteristics

Two hundred and eight RA patients were included [women represented 80% ($n=166$) of the entire sample], with a mean (SD) age and BMI of 54 (12) years and 26.9 (4.6) kg/m^2 , respectively. The mean (SD) duration of the disease, measured from the date of diagnosis, was 14 (10) years. The majority of the patients were seropositive for RF ($n=125$, 60%) and ACPAs ($n=165$, 79%). The mean (SD) DAS28 (4v) and HAQ were 4.2 (1.3) and 1.3 (0.7), respectively. DAS28 criteria for low disease activity were present in 52 (25%) patients. One hundred and seven patients (51%) were under biological original modifying anti-rheumatic drugs (boDMARDs) for a mean (SD) of 33 (37) months, mainly under TNF- α blockers (42%). One hundred seventy and four patients (84%) were under conventional synthetic disease-modifying

antirheumatic drugs (csDMARDs) for a mean (SD) of 100 (85) months. The majority of the RA patients were under low-dose corticosteroids ($n=171$, 82%), with a mean (SD) daily prednisone dosage of 5.2 (4.0) mg and a mean (SD) corticotherapy duration of 12 (9) years.

One hundred and three patients (50%) were osteopenic or osteoporotic; 69 (33%) were under bisphosphonates, for a mean (SD) of 19 (32) months, and 43 (20.7%) were under vitamin D supplements.

None of the 99 postmenopausal women (60%, among female patients) were under selective estrogen receptor modulators or taking hormone therapy (oral or transdermal estrogen preparations with or without a progestin; data not shown). We defined menopause as the absence of menses for greater than 1 year.

Twenty-nine (14%) patients were ever-smokers.

Results of clinical and laboratory variables, including all the medications that potentially could affect bone to some degree, are shown in Supplemental table 1.

LRP5 V667M polymorphism associations

The genotypic frequency of LRP5 V667M polymorphism (88.5% GG, 11.1% AG, and 0.005% AA) was similar to that reported previously in a male Caucasian population (24). The AA genotype was not considered in the analysis since there was only one patient with this rare genotype in our sample (Supplemental table 2). There were no associations of this SNP with BMD in the several skeletal locations evaluated by DXA. In terms of serum biomarkers and SHS parameters, ANOVA only showed two significant associations. Sclerostin ($p=0.004$) and hands JSN score ($p=0.051$) were significantly higher in RA patients with the AG genotype than in those presenting the GG genotype (Table 1). In adjusted multiple linear regression analysis, AG genotype presented as a significant predictor of sclerostin levels in RA patients, independent of age at RA diagnosis, HAQ and time under osteoporosis treatments. Additionally, for hands JSN score, AG genotype remained a significant predictor even after age at RA diagnosis and HAQ had been accounted as confounders (Table 4).

LRP5 N740N polymorphism associations

The minor allele frequency of LRP5 N740N polymorphism (T allele 17, 8%) was similar to that reported previously in a Caucasian population (25) (data not shown). In terms of DXA parameters, total left proximal femur BMD was significantly lower in RA patients with TC genotype versus those with CC genotype ($p=0.046$). ANOVA also revealed that erosion score ($p=0.021$), hands erosion score ($p=0.031$), hands total

score ($p = 0.036$) and total SHS ($p = 0.027$) were significantly higher in RA patients with TT genotype than in those with CC or TC genotypes. In Kruskal-Wallis testing, TT genotype also exhibited significantly lower levels of serum serotonin ($p = 0.030$; Table 2). In crude multiple linear regression analysis, serum serotonin levels were not related with TC or TT genotypes. In adjusted multiple linear regression analysis, TC genotype presented as a significant negative predictor of total proximal femur BMD in RA patients ($p = 0.041$), independent of BMI, age at RA diagnosis, osteoporosis treatment duration and HAQ. Additionally, for erosion score ($p = 0.003$), hands erosion score ($p = 0.006$), hands total score ($p = 0.003$) and total SHS ($p = 0.002$), TT genotype remained a significant predictor even after the age at RA diagnosis and HAQ had been considered as confounders (Table 5).

LRP5 A1330V polymorphism associations

The genotypic frequency of LRP5 A1330V polymorphism (72.1% CC, 24.5% TC, and 3.4% TT; Supplemental table 2) was similar to that reported previously in a Caucasian population (26). There were no associations of this SNP with BMD in the several anatomical regions evaluated by DXA, nor with serum bone biomarkers. In terms of SHS parameters, ANOVA showed several significant associations. Feet JSN score ($p = 0.044$), erosion score ($p = 0.029$), hands erosion score ($p = 0.033$) and total SHS ($p = 0.038$) were significantly higher in RA patients with TT genotype than in those with CC or TC genotypes (Table 3). In adjusted multiple linear regression analysis, TT genotype presented as a significant predictor of feet JSN score ($p = 0.031$), erosion score ($p = 0.005$), hands erosion score ($p = 0.006$) and total SHS ($p = 0.004$) in RA patients, independent of age at RA diagnosis and HAQ (Table 6).

DISCUSSION

LRP5 polymorphisms and radiographic damage in RA patients

In the literature, there is one multi-cohort candidate gene study evaluating the association of genetic variants in genes that encode crucial proteins in the Wnt/ β -catenin pathway [DKK-1, sclerostin, LRP-5, and kremen1 containing transmembrane protein 1 (Kremen-1)], with joint destruction in RA (27). In the first phase of this longitudinal study, on 600 RA patients from Leiden, explorative analyses revealed that six DKK-1 (out of 8), three sclerostin (out of 9), one Kremen-1 (out of 16) and 10 LRP-5 (out of 44) SNPs were significantly

associated with radiological progression of joint destruction in RA. The 10 following LRP5 SNPs were significant in a multivariate regression model, after adjusting for age, sex and treatment strategies: rs3736228 (A1330V), rs4988321 (V667M), rs1996, rs3781579, rs2510389, rs312023, rs4988331, rs12804775, rs546803 and rs2277268. Our results are in line with these, as we have found significant associations of TT genotype for LRP5 A1330V SNP with total SHS, erosion score, hands erosion score and feet JSN score (the last three are total SHS partial items), and of AG genotype for LRP5 V667M SNP with hands JSN score (also a total SHS partial item), independent of age at RA diagnosis and HAQ, for both polymorphisms. However, unlike in our study, de Rooy and colleagues did not evaluate LRP5 rs2306862 (N740N) SNP. In our sample, TT genotype for this last SNP was significantly associated with total SHS, erosion score, hands total and hands erosion scores in RA patients, independently of age at RA diagnosis and HAQ. Our choice of selecting age at RA diagnosis as a confounder instead of patient age was related to its stronger association with SHS and DXA parameters than current age in our sample (data not shown). Moreover it would not be correct to include two age variables in the multivariate model. The option for the HAQ as covariate was due to the fact that HAQ is a robust translation of several variables, such as RA cumulative inflammatory activity over time, disease duration, exposure and duration of exposure to the several drugs used to control the disease activity. The inclusion of HAQ as a covariate avoided compromising the validity of the multivariate model with too many covariates.

In the second phase of the aforementioned study, SNPs significantly associating with joint damage progression were subsequently typed in three other RA longitudinal cohorts [from Groningen (Netherlands), Sheffield (United Kingdom) and Lund (Sweden)] and the obtained data, together with those of the Leiden cohort, were summarized in fixed-effects meta-analysis with inverse variance weighting (27). This option for statistical analysis was due to several facts: all three cohorts studied in phase 2 contained fewer patients and fewer X-ray examinations than the cohort of phase 1, with an insufficient power to replicate findings in each cohort individually or together; differences in study designs made it impossible to combine them directly in one analysis. Three DKK-1 SNPs were significantly associated with progression of joint damage in the meta-analysis, also after correction for multiple testing (rs1896368, rs1896367 and rs1528873), and serum levels of DKK-1 were significantly correlated with the genotypes in rs1896368 ($p=0.02$). In the second phase of the study, owing to technical difficulties, only one of the 10 significant LRP5 SNPs from the first phase (rs3736228) could be typed in the three other cohorts and, unfortunately, showed no significant association with radiographic joint damage progression assuming an

additive model ($p=0.063$). It is not too much to point out that another difference from the aforementioned study is that we evaluated severity of radiographic joint damage in RA patients rather than the radiographic joint damage progression.

LRP5 polymorphisms and BMD in RA patients

In a robust meta-analysis of several studies, Jiayong Yi and colleagues (28) concluded that the A1330V and V667M LRP5 SNPs related to lumbar spine and femoral neck BMD. The pooled data revealed that the A1330V LRP5 polymorphism was associated with BMD at lumbar spine and femoral neck among Caucasians, in agreement with previous genome-wide association studies (28, 29) and an earlier bayesian meta-analysis (30), but not with total hip BMD. In fact, individuals with the AV/VV or VV genotypes had lower BMD than those with the AA genotype in the first 2 above mentioned skeletal regions. However, there was no association between this polymorphism and femoral neck BMD among men or Asians (28). In contrast, Tran and colleagues, as others, found no gender or race specificities in what concerns to A1330V LRP5 SNP effects on BMD (30-32). Furthermore, they mentioned its modest effect size on BMD, explaining only 0.2 to 0.5% of the inter-individual variation. In terms of V667M LRP5 polymorphism, Jiayong Yi and colleagues (28) concluded that Caucasians with VV genotype exhibited a significantly greater BMD than those with the VM/MM genotypes at lumbar spine (in both gender) and femoral neck (exclusively in women), while no association with total hip BMD was observed. The association between LRP5 V667M and lumbar spine BMD was also confirmed in 673 premenopausal Canadian Caucasian women (33). Grundberg and colleagues showed that elderly Swedish men carrying the LRP5 667M allele had a 3.0% lower lumbar spine BMD when compared with those not carrying it (34). Moreover, these findings were not verified in 1068 younger Swedish men, indicating that LRP5 V667M SNP may affect age-dependent bone loss rather than peak bone mass. Additionally, in a French cohort of 78 men with idiopathic osteoporosis and 86 male controls, Ferrari and colleagues showed that the carriers of the haplotype with both minor alleles of V667M and A1330V LRP5 SNPs (A and T, respectively) had an Odds Ratio for osteoporosis of 3.78 versus homozygous carriers of the haplotype with both major alleles (G and C, respectively), independently of environmental factors (24).

On the contrary, in our RA sample, A1330V and V667M LRP5 SNPs were not related with BMD in the several skeletal locations evaluated by DXA. This is in line with Koller and colleagues and Agueda and colleagues studies, which concluded, after analyzing 12 and 23 LRP5 SNPs, respectively, and including

the A1330V and V667M SNPs, that LRP5 genetic variants were not associated with lumbar spine and femoral neck BMD in 1301 white premenopausal women and in 964 Spanish postmenopausal women, respectively (35, 36). Furthermore, A1330V LRP5 SNP was also not associated with BMD in the Slovenian population and among Swedish men (34, 37). Additionally, among Swedish men and in Japanese female RA patients, A1330V genotypes were also not predictive of self-reported fractures or of fracture risk, respectively (34, 38). Agueda and colleagues, after studying those already mentioned 23 LRP5 SNPs in Spanish postmenopausal women, were also unable to demonstrate any association with osteoporotic fractures (36).

On the other hand, it has been observed gender differences in LRP5 SNPs associations. In accordance, van Meurs and colleagues in a large elderly population-based cohort showed that in men, the LRP5 1330V variant was associated with decreased BMD at lumbar spine and femoral neck with evidence for an allele-dose effect, but not with bone loss (32). Additionally, the V allele was also associated with decreased vertebral body size and femoral neck width and male carriers of this allele exhibited a 60% increased risk for fragility fractures, independently of age, height, weight, and BMD. In contrast, in women, all these associations were weaker compared with men, without significance for femoral neck BMD, bone geometry and fracture risk. These findings are in line with those of a previous study (31, 32) with a considerably younger (children and premenopausal women) population, who also showed that this SNP was not associated with bone loss, reinforcing the evidence that the differences between A1330V genotype groups in frame size and BMD are achieved early in life.

Moreover, Kiel and colleagues in a genetic association study, using the population-based Framingham Study Offspring Cohort, also concluded that LRP5 SNPs associations explain a greater proportion of BMD variance in younger men than in women (25). In men aged 60 years or less, LRP5 SNPs were significantly associated with BMD, namely, rs4988321 (V667M) with Ward's BMD and rs2306862 (N740N) on Exon 10 with BMD at femoral neck and Ward's triangle. They also found a significant interaction between physical activity and rs2306862 (N740N) in exon 10 and rs3736228 (A1330V) in exon 18 on spine BMD in men. In both polymorphisms, the TT genotype was associated with lower BMD in men with higher physical activity scores, conversely with higher BMD in men with lower physical activity scores. This favors the hypothesis that differences in muscle strength or physical activity between men and women could modulate the influence of LRP5 polymorphisms on bone mass, explaining those gender-related differences.

This was also the first demonstration that the LRP5 gene may be implicated in the adaptation of bone to mechanical load in humans, as previously suggested in mice (25, 39). Unfortunately, our population lacked the sufficient sample size to demonstrate the presence of gender discrepancies in these LRP5 SNPs due to the low representation of the male gender. Additionally, in our study protocol, we also failed to include appropriate questionnaires in order to evaluate physical activity in our RA patients. In our sample, although we did not find significant differences in BMD between the 3 possible genotypes of the N740N LRP5 polymorphism, when we suppress the rare TT genotype, total left proximal femur BMD was significantly lower in RA patients with TC genotype versus those with CC genotype, in accordance with Kiel findings. In fact, TC genotype presented as a significant negative predictor of total left proximal femur BMD in our RA patients, independent of BMI, age at RA diagnosis, osteoporosis treatment duration and HAQ. Curiously, in the adjusted multiple linear regression analysis model, HAQ, as expected, was also a significant negative predictor of total left proximal femur BMD in our sample with lower β and p values than TC genotype itself, reinforcing the determinant effect of chronic inflammation on bone mass in RA. On the contrary, Koay and colleagues, in a cohort of prepubertal and early pubertal British children, observed that the rs2306862 (N740N) LRP5 polymorphism was associated with spinal BMD, spinal area-adjusted bone mineral content (aBMC), total-body BMD and aBMC, after adjusting for age, gender, pubertal status, and body size parameters (40). They showed that individuals with TT genotype had greater spinal BMD and aBMC scores than those with CC genotype, TC individuals presented an intermediate value.

Finally, we can also mention the growing evidence for a marked influence of LRP5 SNPs in BMD early in life. Laine and colleagues, in a cohort of 27 children/adolescents with primary osteoporosis, after excluding the diagnosis of osteogenesis imperfecta, observed a significantly higher minor allele frequency of V667M, N740N, and A1330V LRP5 polymorphisms than in controls (41).

LRP5 polymorphisms and serum bone markers in RA patients

There is lack of data in what concerns to the relation of LRP5 SNPs and bone metabolism biomarkers. Massart and colleagues, among 570 healthy fertile Caucasian women who were genotyped for LRP5 rs4988321 (A/G) and rs3736228 (C/T) SNPs, showed that GG and CC genotypes exhibited, respectively and for each SNP, higher age-adjusted values of osteocalcin, β -CTX and N-terminal propeptide of type I procollagen (PINP) (42). In contrast, in another genetic association study with the same

SNPs in Greek peri- and postmenopausal women, no effect was observed on circulating levels of OPG, RANKL and other bone metabolic markers (43). Moreover, in Chinese postmenopausal women, A1330V LRP5 SNP was not correlated to bone turnover markers [serum levels of calcium, phosphate, alkaline phosphatase, β -CTX and 25(OH) vitamin D3] (44). These latter findings are in line with ours, apart from the fact we observed a strong positive association between serum sclerostin levels and AG genotype of the V667M LRP5 polymorphism, whose significance is unknown. This fact can be related to functional aspects of this LRP5 variant, since it affects the initial part of the third extracellular β -propeller LRP5 domain, which binds with DKK-1 and is only separated by an epidermal growth factor (EGF)-like repeat from the nearby second β -propeller domain which in turn binds with sclerostin (45).

Study limitations

The major limitation of this study is related to the small sample size, which impaired haplotype analysis for example. The low representativeness of early and very early RA patients in our sample also precludes the extrapolation of the obtained results to patients with less disease duration.

CONCLUSIONS

We demonstrated significant associations between three LRP5 genetic polymorphisms (A1330V, V667M, and N740N), which encode a crucial protein in the Wnt/ β -catenin pathway, and the severity of radiographic joint destruction in RA. Ours is the second cohort candidate gene study to do so. These findings allow us to speculate about a future role of therapies targeting the canonical Wnt/ β -catenin pathway in RA, namely the new emerging anti-sclerostin therapies (romosozumab and blosozumab). Curiously, the N740N LRP5 polymorphism (specifically the TC genotype) presented as a significant negative predictor of femoral BMD in our RA patients. And, although A1330V and V667M LRP5 SNPs related to lumbar and femoral BMD among Caucasians, we did not verify these associations similarly to studies carried out in the healthy Spanish population.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to acknowledge Associação Nacional de Reumatologia for the doctoral grant, Conceição Gonçalves (MSc) from the Laboratório Nobre in the Faculty of Medicine of the University of Porto, the nursing Service of Rheumatology Day Hospital of São João Hospital Centre, and the clinicians from the Rheumatology Department of São João Hospital Center, especially Alexandra Bernardo (M.D.) and Sofia Pimenta (M.D.).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MB conceived the idea of the study, designed the study, coordinated the project, participated in patient recruitment and in data acquisition, drafted the manuscript and takes responsibility for the integrity of the data analysis. AO performed DXA evaluations and revised the manuscript. MJM coordinated the experimental work (ELISA), assisted in manuscript drafting, takes responsibility for the integrity of the data analysis and revised the manuscript. RL performed the statistical analysis, revised the manuscript and takes responsibility for the integrity of the data analysis. JGP performed DXA evaluations and approved the final version of the manuscript. LC participated in patient recruitment and approved the final version of the manuscript. IR performed X-ray evaluations, ensured the optimal conditions for radiographic scoring and approved the final version of the manuscript. JCM conceived the idea of the study, coordinated the experimental work (LRP5 genotyping), assisted in manuscript drafting, takes responsibility for the integrity of the data analysis and revised the manuscript. FSV coordinated the project, participated in patient recruitment and revised the manuscript.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

CONFLICT OF INTERESTS

Miguel Bernardes, Ana Oliveira, Maria João Martins, Raquel Lucas, Lúcia Costa, Jorge G. Pereira, Isabel Ramos, José Carlos Machado and Francisco Simões-Ventura declare that they have no conflict of interests regarding the publication of this paper. Associação Nacional de Reumatologia, the study sponsor, had no

role in the study design; in the collection, analysis and interpretation of the data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication.

ETHICAL APPROVAL

The study protocol was approved by the São João Hospital Centre (Porto, Portugal) Ethical Committee.

HUMAN RIGHTS

All procedures performed in the study involving human participants were in accordance with the ethical standards of São João Hospital Centre (Porto, Portugal) Ethical Committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

INFORMED CONSENT

Informed consent was obtained from each patient.

REFERENCES

1. Corrado A, Maruotti N, Cantatore FP. Osteoblast Role in Rheumatic Diseases. *Int J Mol Sci.* 2017;18(6).
2. Baum R, Gravallesse EM. Bone as a Target Organ in Rheumatic Disease: Impact on Osteoclasts and Osteoblasts. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2016;51(1):1-15.
3. Schett G, Gravallesse E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Rev Rheumatol.* 2012;8(11):656-64.
4. Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest.* 1999;103(9):1345-52.
5. Harre U, Kittan NA, Schett G. Autoantibody-mediated bone loss. *Curr Osteoporos Rep.* 2014;12(1):17-21.
6. Harre U, Georgess D, Bang H, Bozec A, Axmann R, Ossipova E, et al. Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J Clin Invest.* 2012;122(5):1791-802.

7. Kleyer A, Finzel S, Rech J, Manger B, Krieter M, Faustini F, et al. Bone loss before the clinical onset of rheumatoid arthritis in subjects with anticitrullinated protein antibodies. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(5):854-60.
8. Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum*. 2004;50(2):380-6.
9. Deodhar A, Dore RK, Mandel D, Schechtman J, Shergy W, Trapp R, et al. Denosumab-mediated increase in hand bone mineral density associated with decreased progression of bone erosion in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2010;62(4):569-74.
10. Cohen SB, Dore RK, Lane NE, Ory PA, Peterfy CG, Sharp JT, et al. Denosumab treatment effects on structural damage, bone mineral density, and bone turnover in rheumatoid arthritis: a twelve-month, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II clinical trial. *Arthritis Rheum*. 2008;58(5):1299-309.
11. Herrak P, Gortz B, Hayer S, Redlich K, Reiter E, Gasser J, et al. Zoledronic acid protects against local and systemic bone loss in tumor necrosis factor-mediated arthritis. *Arthritis Rheum*. 2004;50(7):2327-37.
12. Ideguchi H, Ohno S, Hattori H, Senuma A, Ishigatsubo Y. Bone erosions in rheumatoid arthritis can be repaired through reduction in disease activity with conventional disease-modifying antirheumatic drugs. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(3):R76.
13. Regard JB, Zhong Z, Williams BO, Yang Y. Wnt signaling in bone development and disease: making stronger bone with Wnts. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(12).
14. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med*. 2007;13(2):156-63.
15. Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, et al. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem*. 2005;280(20):19883-7.
16. Heiland GR, Zwerina K, Baum W, Kireva T, Distler JH, Grisanti M, et al. Neutralisation of Dkk-1 protects from systemic bone loss during inflammation and reduces sclerostin expression. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(12):2152-9.
17. Bernardes M, Vieira T, Lucas R, Pereira J, Costa L, Simoes-Ventura F, et al. Serum serotonin levels and bone in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol Int*. 2017;37(11):1891-8.
18. de Rooy DP, van der Linden MP, Knevel R, Huizinga TW, van der Helm-van Mil AH. Predicting arthritis outcomes—what can be learned from the Leiden Early Arthritis Clinic? *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50(1):93-100.
19. Knevel R, Grondal G, Huizinga TW, Visser AW, Jonsson H, Vikingsson A, et al. Genetic predisposition of the severity of joint destruction in rheumatoid arthritis: a population-based study. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(5):707-9.
20. Reynolds T. Declaration of Helsinki revised. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(22):1801-3.
21. Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1995;38(1):44-8.
22. Bernardes M, Vieira TS, Martins MJ, Lucas R, Costa L, Pereira JG, et al. Myocardial Perfusion in Rheumatoid Arthritis Patients: Associations with Traditional Risk Factors and Novel Biomarkers. *Biomed Res Int*. 2017;2017:6509754.
23. van der Heijde D. How to read radiographs according to the Sharp/van der Heijde method. *J Rheumatol*. 2000;27(1):261-3.
24. Ferrari SL, Deutsch S, Baudoin C, Cohen-Solal M, Ostertag A, Antonarakis SE, et al. LRP5 gene polymorphisms and idiopathic osteoporosis in men. *Bone*. 2005;37(6):770-5.
25. Kiel DP, Ferrari SL, Cupples LA, Karasik D, Manen D, Imamovic A, et al. Genetic variation at the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) locus modulates Wnt signaling and the relationship of physical activity with bone mineral density in men. *Bone*. 2007;40(3):587-96.

26. Zofkova I, Hill M, Zajickova K. Association of C/T polymorphism in the LRP5 gene with circulating follicle stimulating hormone in Caucasian postmenopausal women. *Physiol Res.* 2007;56(6):735-9.
27. de Rooy DP, Yeremenko NG, Wilson AG, Knevel R, Lindqvist E, Saxne T, et al. Genetic studies on components of the Wnt signalling pathway and the severity of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(5):769-75.
28. Yi J, Cai Y, Yao Z, Lin J. Genetic analysis of the relationship between bone mineral density and low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene polymorphisms. *PLoS One.* 2013;8(12):e85052.
29. Richards JB, Rivadeneira F, Inouye M, Pastinen TM, Soranzo N, Wilson SG, et al. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *Lancet.* 2008;371(9623):1505-12.
30. Tran BN, Nguyen ND, Eisman JA, Nguyen TV. Association between LRP5 polymorphism and bone mineral density: a Bayesian meta-analysis. *BMC Med Genet.* 2008;9:55.
31. Ferrari SL, Deutsch S, Choudhury U, Chevalley T, Bonjour JP, Dermitzakis ET, et al. Polymorphisms in the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) gene are associated with variation in vertebral bone mass, vertebral bone size, and stature in whites. *Am J Hum Genet.* 2004;74(5):866-75.
32. van Meurs JB, Rivadeneira F, Jhamai M, Hagens W, Hofman A, van Leeuwen JP, et al. Common genetic variation of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 and 6 genes determines fracture risk in elderly white men. *J Bone Miner Res.* 2006;21(1):141-50.
33. Giroux S, Elfassihi L, Cole DE, Rousseau F. Replication of associations between LRP5 and ESRRA variants and bone density in premenopausal women. *Osteoporos Int.* 2008;19(12):1769-75.
34. Grundberg E, Lau EM, Lorentzon M, Karlsson M, Holmberg A, Groop L, et al. Large-scale association study between two coding LRP5 gene polymorphisms and bone phenotypes and fractures in men. *Osteoporos Int.* 2008;19(6):829-37.
35. Koller DL, Ichikawa S, Johnson ML, Lai D, Xuei X, Edenberg HJ, et al. Contribution of the LRP5 gene to normal variation in peak BMD in women. *J Bone Miner Res.* 2005;20(1):75-80.
36. Agueda L, Bustamante M, Jurado S, Garcia-Giralt N, Ciria M, Salo G, et al. A haplotype-based analysis of the LRP5 gene in relation to osteoporosis phenotypes in Spanish postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2008;23(12):1954-63.
37. Mencej-Bedrac S, Prezelj J, Kocjan T, Komadina R, Marc J. Analysis of association of LRP5, LRP6, SOST, DKK1, and CTNNB1 genes with bone mineral density in a Slovenian population. *Calcif Tissue Int.* 2009;85(6):501-6.
38. Furuya T, Urano T, Ikari K, Kotake S, Inoue S, Hara M, et al. A1330V polymorphism of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene and self-reported incident fractures in Japanese female patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 2009;19(2):140-6.
39. Akhter MP, Wells DJ, Short SJ, Cullen DM, Johnson ML, Haynatzki GR, et al. Bone biomechanical properties in LRP5 mutant mice. *Bone.* 2004;35(1):162-9.
40. Koay MA, Tobias JH, Leary SD, Steer CD, Vilarino-Guell C, Brown MA. The effect of LRP5 polymorphisms on bone mineral density is apparent in childhood. *Calcif Tissue Int.* 2007;81(1):1-9.
41. Laine CM, Koltin D, Susic M, Varley TL, Daneman A, Moineddin R, et al. Primary osteoporosis without features of OI in children and adolescents: clinical and genetic characteristics. *Am J Med Genet A.* 2012;158A(6):1252-61.
42. Massart F, Marini F, Bianchi G, Minisola S, Luisetto G, Pirazzoli A, et al. Genetic predictors of skeletal outcomes in healthy fertile women: the Bonturno study. *Joint Bone Spine.* 2013;80(4):414-9.
43. Markatseli AE, Hatz E, Bouba I, Georgiou I, Challa A, Tigas S, et al. Association of the A1330V and V667M polymorphisms of LRP5 with bone mineral density in Greek peri- and postmenopausal women. *Maturitas.* 2011;70(2):188-93.

44. Zhou PR, Liu HJ, Liao EY, Zhang ZL, Chen DC, Liu J, et al. LRP5 polymorphisms and response to alendronate treatment in Chinese postmenopausal women with osteoporosis. *Pharmacogenomics*. 2014;15(6):821-31.
45. Balemans W, Van Hul W. The genetics of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 in bone: a story of extremes. *Endocrinology*. 2007;148(6):2622-9.

Table 1. Differences between LRP5 V667M genotypes in terms of dual-energy X-ray absorptiometry, Sharp/van der Heijde score, and laboratory parameters, as determined by ANOVA, in Rheumatoid Arthritis patients.

Characteristics	LRP5 V667M			<i>p</i>
	GG	AG	AA*	
DXA-related parameters				
Total left proximal femur BMD (g/cm ²)	0.937 (0.148)	0.878 (0.153)	-	0.095
Lumbar spine BMD (g/cm ²)	1.078 (0.174)	1.046 (0.168)	-	0.440
Left hand BMD (g/cm ²)	0.387 (0.068)	0.369 (0.075)	-	0.325
Disease-related parameters				
Hands JSN score	54.845 (26.015)	66.318 (24.412)	-	0.051
Feet JSN score	25.477 (9.547)	27.043 (9.388)	-	0.460
JSN score	80.267 (32.162)	93.409 (28.713)	-	0.070
Hands erosion score	37.247 (30.205)	47.091 (27.024)	-	0.147
Feet erosion score	23.270 (25.491)	27.348 (23.801)	-	0.469
Erosion score	60.378 (50.827)	74.682 (43.899)	-	0.209
Hands total score	92.098 (52.161)	113.409 (46.631)	-	0.070
Feet total score	48.805 (32.068)	54.682 (30.813)	-	0.417
Total SHS	140.651 (77.674)	168.091 (67.408)	-	0.115
Serum biomarkers				
β-CTX, ng/mL	0.285 (0.182)	0.290 (0.227)	-	0.906
Osteocalcin, ng/mL	16.707 (7.835)	17.683 (9.190)	-	0.582
DKK-1, pmol/L	100.064 (60.821)	92.061 (42.433)	-	0.541

Sclerostin, ng/mL	0.236 (0.090)	0.299 (0.133)	-	0.004
OPG, pmol/L	3.839 (1.954)	4.248 (1.971)	-	0.345
RANKL, pmol/L	3819.595 (2111.844)	3677.778 (1690.540)	-	0.758
OPG/RANKL ratio	0.00142 (0.00158)	0.00219 (0.00308)	-	0.478†
Serotonin, ng/mL	175.815 (102.180)	206.609 (155.804)	-	0.207/0.715†

Results are presented as mean (SD). *AA genotype was not considered in the analysis since there was only one patient with this rare genotype in our sample. †Mann-Whitney test. AA, adenine-adenine; AG, adenine-guanine; ANOVA, one-way analysis of variance; β -CTX, β -isomerised carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen; BMD, bone mineral density; DKK-1, dickkopf-1; DXA, dual-energy X-ray absorptiometry; GG, guanine-guanine; JSN, joint space narrowing; LRP5, lipoprotein receptor-related protein-5; M, methionine; OPG, osteoprotegerin; RANKL, receptor activator of nuclear factor- κ B ligand; SHS, Sharp/van der Heijde score; V, valine.

Table 2. Differences between LRP5 N740N genotypes in terms dual-energy X-ray absorptiometry, Sharp/van der Heijde score, and laboratory parameters, as determined by ANOVA, in Rheumatoid Arthritis patients

Characteristics	LRP5 N740N			p
	CC	TC	TT	
DXA-related parameters				
Total left proximal femur BMD (g/cm ³)	0.943 (0.146)	0.891 (0.158)	-	0.046
Total left proximal femur BMD (g/cm ³)	0.943 (0.146)	0.891 (0.158)	0.964 (0.107)	0.105
Lumbar spine BMD (g/cm ³)	1.080 (0.167)	1.048 (0.181)	-	0.277
Lumbar spine BMD (g/cm ³)	1.080 (0.167)	1.048 (0.181)	1.132 (0.208)	0.332
Left hand BMD (g/cm ³)	0.388 (0.066)	0.378 (0.080)	-	0.458
Left hand BMD (g/cm ³)	0.388 (0.066)	0.378 (0.080)	0.365 (0.054)	0.562
Disease-related parameters				
Hands JSN score	55.507 (24.900)	54.596 (27.865)	104.222 (32.984)	0.107
Feet JSN score	24.719 (9.454)	27.389 (9.360)	63.000 (34.340)	0.071

JSN score	80.231 (31.007)	81.865 (33.180)	43.000 (36.332)	0.092
Hands erosion score	38.235 (29.378)	34.654 (29.078)	63.000 (34.340)	0.031
Hands erosion score	38.235 (29.378)	34.654 (29.078)	-	0.434
Feet erosion score	23.096 (25.034)	22.315 (22.670)	43.000 (36.332)	0.063
Erosion score	61.455 (50.090)	56.212 (46.267)	106.000 (55.489)	0.021
Erosion score	61.455 (50.090)	56.212 (46.267)	-	0.541
Hands total score	93.750 (50.296)	89.250 (52.791)	136.889 (54.760)	0.036
Hands total score	93.750 (50.296)	89.250 (52.791)	-	0.589
Feet total score	47.889 (31.580)	49.736 (29.204)	73.333 (43.784)	0.067
Total SHS	141.694 (75.787)	138.077 (74.049)	210.222 (84.320)	0.027
Total SHS	141.694 (75.787)	138.077 (74.049)	-	0.769
Serum biomarkers				
β -CTX, ng/mL	0.282 (0.178)	0.299 (0.217)	0.269 (0.151)	0.810
Osteocalcin, ng/mL	16.798 (7.866)	17.111 (8.290)	15.789 (8.316)	0.894
DKK-1, pmol/L	97.743 (44.653)	105.361 (87.374)	90.044 (41.546)	0.846
Sclerostin, ng/mL	0.242 (0.095)	0.242 (0.107)	0.278 (0.075)	0.560
OPG, pmol/L	3.936 (2.037)	3.718 (1.561)	4.156 (2.778)	0.714
RANKL, pmol/L	3831.421 (2174.613)	3673.582 (1843.707)	4065.929 (1495.371)	0.828
OPG/RANKL ratio	0.00146 (0.00168)	0.00170 (0.00222)	0.00122 (0.00108)	0.750*
Serotonin, ng/mL	174.544 (102.301)	205.596 (128.134)	109.111 (49.542)	0.030*

Results are presented as mean (SD). *Kruskal-Wallis test. ANOVA, one-way analysis of variance; β -CTX, β -isomerised carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen; BMD, bone mineral density; CC, cytosine-cytosine; DKK-1, dickkopf-1; DXA, dual-energy X-ray absorptiometry; JSN, joint space narrowing score; LRP5, lipoprotein receptor-related protein-5; N, asparagine; OPG, osteoprotegerin; RANKL, receptor activator of nuclear factor- κ B ligand; SHS, Sharp/van der Heijde score; TC, thymine-cytosine; TT, thymine-thymine.

Table 3. Differences between LRP5 A1330V genotypes in terms dual-energy X-ray absorptiometry, Sharp/van der Heijde score, and laboratory parameters, as determined by ANOVA, in Rheumatoid Arthritis patients

Characteristics	LRP5A1330V			<i>p</i>
	CC	TC	TT	
DXA-related parameters				
Total left proximal femur BMD (g/cm ²)	0.940 (0.147)	0.905 (0.152)	-	0.189
Total left proximal femur BMD (g/cm ²)	0.940 (0.147)	0.905 (0.152)	0.895 (0.175)	0.355
Lumbar spine BMD (g/cm ²)	1.079 (0.169)	1.049 (0.174)	-	0.305
Lumbar spine BMD (g/cm ²)	1.079 (0.169)	1.049 (0.174)	1.133 (0.247)	0.398
Left hand BMD (g/cm ²)	0.388 (0.066)	0.379 (0.077)	-	0.481
Left hand BMD (g/cm ²)	0.388 (0.066)	0.379 (0.077)	0.346 (0.058)	0.284
Disease-related parameters				
Hands JSN score	54.866 (25.111)	57.500 (27.845)	71.714 (28.365)	0.225
Feet JSN score	24.803 (9.407)	27.347 (9.718)	32.429 (6.503)	0.044
Feet JSN score	24.803 (9.407)	27.347 (9.718)	-	0.107
JSN score	79.593 (31.096)	84.875 (33.378)	104.143 (32.091)	0.103
Hands erosion score	37.465 (29.321)	37.042 (29.514)	67.286 (34.223)	0.033
Hands erosion score	37.465 (29.321)	37.042 (29.514)	-	0.931
Feet erosion score	22.937 (24.789)	23.367 (24.021)	44.000 (36.446)	0.096
Erosion score	60.229 (49.716)	60.438 (46.658)	111.286 (62.278)	0.029
Erosion score	60.229 (49.716)	60.438 (46.658)	-	0.980
Hands total score	92.338 (50.380)	94.542 (52.976)	139.000 (59.172)	0.066
Feet total score	47.810 (31.245)	50.771 (31.066)	76.429 (41.271)	0.064
Total SHS	139.829 (75.346)	145.313 (75.006)	215.429 (91.904)	0.038
Total SHS	139.829 (75.346)	145.313 (75.006)	-	0.664

Serum biomarkers				
β-CTX, ng/mL	0.277 (0.177)	0.318 (0.218)	0.239 (0.160)	0.331
Osteocalcin, ng/mL	16.629 (7.799)	17.929 (8.617)	13.314 (5.785)	0.298
Dkk1, pmol/L	98.829 (45.330)	99.635 (89.286)	111.886 (48.542)	0.234
Sclerostin, ng/mL	0.239 (0.094)	0.253 (0.110)	0.257 (0.090)	0.659
OPG, pmol/L	3.978 (2.006)	3.465 (1.517)	5.000 (2.994)	0.082
RANKL, pmol/L	3782.246 (2158.205)	3875.819 (1902.143)	3638.683 (804.408)	0.942
OPG/RANKL ratio	0.001500 (0.00170)	0.00153 (0.00222)	0.00151 (0.00113)	0.567*
Serotonin, ng/mL	177.056 (103.705)	188.708 (124.677)	173.000 (129.7009)	0.807

Results are presented as mean (SD). *Kruskal-Wallis test. A, alanine; ANOVA, one-way analysis of variance; β-CTX, β-isomerised carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen; BMD, bone mineral density; CC, cytosine-cytosine; DKK-1, dickkopf-1; DXA, dual-energy X-ray absorptiometry; JSN, joint space narrowing; LRP5, lipoprotein receptor-related protein-5; OPG, osteoprotegerin; RANKL, receptor activator of nuclear factor-κappa B ligand; SHS, Sharp/van der Heijde score; TC, thymine-cytosine; TT, thymine-thymine; V, valine.

Table 4. Linear regression coefficients for the adjusted associations between LRP5V667M polymorphism and disease-related and serum outcomes in Rheumatoid Arthritis patients.

Outcome	Predictors	β	p	95% CI for β		Model R ²
				Lower	Upper	
Disease-related parameter						
Hands JSN score	AC LRP5V667M	10.818	0.039	0.553	21.082	0.248
	Age at RA diagnosis	-0.788	<0.001	-1.032	-0.544	
	HAQ	10.170	<0.001	5.614	14.726	
Serum biomarker						
	AC LRP5V667M	0.0567	0.007	0.0153	0.0980	

Sclerostin (ng/mL)	Age at RA diagnosis	0.00187	<0.001	0.000890	0.00286	0.113
	HAQ	-0.00210	0.830	-0.0213	0.0172	
	Osteoporosis treatment duration	0.000220	0.328	-0.000223	0.000662	

AG, adenine-guanine; β , regression beta coefficient; CI, confidence interval; HAQ, Health Assessment Questionnaire; JSN, joint space narrowing; LRP5, lipoprotein receptor-related protein-5; M, methionine; RA, Rheumatoid Arthritis; V, valine.

Table 5. Linear regression coefficients for the adjusted associations between LRP5N740N polymorphism and disease-related, dual-energy X-ray absorptiometry-related and serum outcomes in Rheumatoid Arthritis patients.

Outcome	Predictors	β	p	95% CI for β		Model R^2
				Lower	Upper	
DXA-related parameter						
Total left proximal femur BMD	TC	-0.0488	0.041	-0.0957	-0.0020	0.224
	LRP5N740N					
	BMI	0.0066	0.005	0.0021	0.0112	
	Age at RA diagnosis	-0.0001	0.905	-0.0018	0.0016	
	Osteoporosis treatment duration	-0.0011	0.001	-0.0017	-0.0279	
	HAQ	-0.0584	<0.001	-0.0889	-0.0279	
Disease-related parameters						
	TC	-5.591	0.209	-14.344	3.163	0.202
	LRP5N740N					
	TT	26.086	0.006	7.725	44.448	
	LRP5N740N					

Hands erosion score	Age at RA diagnosis	-0.567	<0.001	-0.856	-0.278	
	HAQ	13.921	<0.001	8.565	19.277	
Erosion score	TC LRP5N740N	-8.977	0.225	-23.521	5.566	0.214
	TT LRP5N740N	46.927	0.003	16.462	77.392	
	Age at RA diagnosis	-0.961	<0.001	-1.441	-0.481	
	HAQ	23.577	<0.001	14.686	32.468	
Hands total score	TC LRP5N740N	-8.161	0.272	-22.781	6.459	0.260
	TT LRP5N740N	46.941	0.003	16.273	77.610	
	Age at RA diagnosis	-1.366	<0.001	-1.848	-0.883	
	HAQ	24.616	<0.001	15.670	33.561	
Total SHS	TC LRP5N740N	-9.490	0.387	-31.097	12.116	0.264
	TT LRP5N740N	73.849	0.002	28.590	119.108	
	Age at RA diagnosis	-1.914	<0.001	-2.628	-1.201	
	HAQ	38.085	<0.001	24.876	51.294	
Serum biomarker						
Log Serotonin	TC LRP5N740N	0.143*	0.177	-0.065	0.350	0.028
	TT LRP5N740N	-0.383*	0.086	-0.821	0.055	

*Crude coefficients. β , regression beta coefficient; BMD, bone mineral density; BMI, body mass index; CI, confidence interval; DXA, dual-energy X-ray absorptiometry; HAQ, Health Assessment Questionnaire; Log, logarithm; LRP5, lipoprotein receptor-related protein-5; N, asparagine; RA, Rheumatoid Arthritis; SHS, Sharp/van der Heijde score; TC, thymine-cytosine; TT, thymine-thymine.

Table 6. Linear regression coefficients for the adjusted associations between LRP5A1330V polymorphism and disease-related outcomes in Rheumatoid Arthritis patients.

Outcome	Predictors	β	p	95% CI for β		Model R^2
				Lower	Upper	
Disease-related parameters						
Feet JSN score	TC LRP5A1330V	2.147	0.148	-0.772	5.065	0.148
	TT LRP5A1330V	7.510	0.031	0.709	14.311	
	Age at RA diagnosis	-0.153	0.002	-0.247	-0.059	
	HAQ	3.665	<0.001	1.912	5.418	
Hands erosion score	TC LRP5A1330V	-2.379	0.603	-11.399	6.640	0.194
	TT LRP5A1330V	29.235	0.006	8.404	50.065	
	Age at RA diagnosis	-0.565	<0.001	-0.855	-0.274	
	HAQ	13.467	<0.001	8.071	18.862	
Erosion score	TC LRP5A1330V	-3.479	0.648	-18.497	11.539	0.201
	TT LRP5A1330V	50.184	0.005	15.547	84.821	
	Age at RA diagnosis	-0.955	<0.001	-1.439	-0.471	
	HAQ	22.816	<0.001	13.838	31.794	
Total SHS	TC LRP5A1330V	-0.274	0.981	-22.602	22.054	0.251
	TT LRP5A1330V	79.128	0.004	24.632	127.624	
	Age at RA diagnosis	-1.901	<0.001	-2.621	-1.181	

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

	HAQ	36.957	<0.001	23.608	50.305	
--	------------	---------------	------------------	---------------	---------------	--

A, alanine; β , regression beta coefficient; CI, confidence interval; HAQ, Health Assessment Questionnaire;
JSN, joint space narrowing; LRP5, lipoprotein receptor-related protein-5; RA, Rheumatoid Arthritis; SHS,
Sharp/van der Heijde score; TC, thymine-cytosine; TT, thymine-thymine; V, valine.

Supplemental table 1. Rheumatoid Arthritis patients' clinical and laboratorial characteristics.

Characteristic	Total sample
Patient-related parameters	N= 208
Female, n (%)	166 (79.8)
Postmenopausal, n (%)	99 (59.6)
Time since menopause, mean (SD), years	7.400 (8.434)
Male, n (%)	42 (20.2)
Age, mean (SD), years	53.520 (11.578)
BMI, mean (SD), kg/m ²	26.948 (4.608)
< 25	77 (37.0)
25 ≤ BMI < 30	86 (41.3)
≥ 30	45 (21.7)
Ever smokers, n (%)	29 (13.9)
Disease-related parameters	
Diagnosis age, mean (SD), years	39.770 (13.352)
Disease duration, mean (SD), years	13.770 (10.083)
RF, mean (SD), U/mL	135.576 (246.641)
RF positivity (≥ 30 U/mL), n (%)	125 (60.1)
ACPAs, mean (SD), U/mL	519.666 (1199.020)
ACPAs positivity (> 7 U/mL), n (%)	165 (79.3)
Extra-articular manifestations, n (%)	68 (32.7)
DAS28 (4V), mean (SD)	4.249 (1.329)
DAS28 (3V), mean (SD)	4.080 (1.292)
DAS28 (4v; CRP), mean (SD)	3.721 (1.271)
DAS28 (3v; CRP), mean (SD)	3.504 (1.249)
Disease activity – DAS28 (4V)	
Low (DAS28(4v) ≤ 3.2)	52 (25.0)
Moderate (3.2 < DAS28(4v) ≤ 5.1)	103 (49.5)
High (DAS28(4v) > 5.1)	53 (25.5)
TJC (out of 68), mean (SD)	11.582 (12.120)
SJC (out of 66), mean (SD)	4.664 (5.238)
ESR, mean (SD), mm (first hour)	26.990 (20.090)
CRP, mean (SD), mg/L	11.582 (12.120)
HAQ score, mean (SD)	1.254 (0.709)
HAQ ≤ 0.5, n (%)	43 (20.7)
Erosion score, mean (SD)	62.113 (50.088)
JSN score, mean (SD)	81.774 (31.913)
Total SHS, mean (SD)	143.892 (76.739)
DXA-related parameters	
Total left proximal femur BMD, mean (SD), g/cm ³	0.931 (0.149)
Lumbar spine BMD, mean (SD), g/cm ³	1.074 (0.173)
Left hand BMD, mean (SD), g/cm ³	0.385 (0.069)
WHO classification	
Normal, n (%)	105 (50.4)
Osteopenia, n (%)	70 (33.7)
Osteoporosis, n (%)	33 (15.9)
Disease-related treatment parameters	
Symptomatic	
Corticosteroids, n (%)	171 (82.2)
Daily dose in prednisolone equivalents, mean (SD), mg	5.203 (3.950)
Time under corticosteroids, mean (SD), years	11.519 (9.041)
NSAIDs, n (%)	159 (76.4)

csDMARDs	174 (83.7)
Exclusively, n (%)	101 (48.6)
Cumulative, mean (SD)	2.500 (1.390)
Time under csDMARDs, mean (SD), months	99.773 (85.133)
Methotrexate, n (%)	141 (67.8)
Leflunomide, n (%)	44 (21.2)
Hydroxychloroquine, n (%)	13 (6.3)
Sulfasalazine, n (%)	13 (6.3)
Cyclosporine, n (%)	3 (1.4)
Azathioprine, n (%)	2 (1.0)
boDMARDs, n (%)	107 (51.4)
Monotherapy, n (%)	32 (29.9)
Time under biologics, mean (SD), months	32.527 (37.402)
TNF α blockers, n (%)	87 (41.8)
Adalimumab, n (%)	29 (13.9)
Etanercept, n (%)	42 (20.2)
Infliximab, n (%)	16 (7.7)
Rituximab, n (%)	13 (6.3)
Anakinra, n (%)	3 (1.4)
Tocilizumab, n (%)	4 (1.9)
Bisphosphonates, n (%)	69 (33.2)
Time under bisphosphonates, mean (SD), months	18.625 (31.967)
Vitamin D supplements, n (%)	43 (20.7)
Folic acid supplements, n (%)	108 (51.9)
Proton pump inhibitors, n (%)	147 (70.7)
SSRIs, n (%)	13 (6.3)
Serum biomarkers	
Homocysteine, mean (SD), μ mol/L	10.664 (3.619)
>12.44	44 (21.2)
Folic acid, mean (SD), ng/mL	9.153 (4.571)
<2.2	1 (0.5)
Creatinine, mean (SD), mg/L	8.811 (2.292)
>10	38 (18.3)
Calcium, mean (SD), mEq/L	4.704 (0.187)
Phosphorus, mean (SD), mg/L	31.790 (5.767)
Alkaline phosphatase, mean (SD), U/L	72.635 (24.258)
25(OH) vitaminD3, mean (SD), ng/mL	25.583 (12.482)
<15	27 (13.0)
15 \leq 25(OH) vitaminD3 <30	109 (52.4)
\geq 30	72 (34.6)
β -CTX, mean (SD), ng/mL	0.286 (0.187)
Osteocalcin, mean (SD), ng/mL	16.839 (7.967)
Intact PTH, mean (SD), pg/mL	43.145 (19.645)
>65	24 (11.5)
DKK-1, mean (SD), pmol/L	99.469 (59.037)
Sclerostin, mean (SD), ng/mL	0.243 (0.098)
OPG, mean (SD), pmol/L	3.886 (1.950)
RANKL, mean (SD), pmol/L	3800.146 (2059.584)
OPG/RANKL ratio, mean (SD)	0.00154 (0.00183)

Serotonin, mean (SD), ng/mL	179.268 (108.497)
-----------------------------	-------------------

ACPA, anti-citrullinated protein antibodies; β -CTX, beta-carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen; BMD, bone mineral density; BMI, body mass index; boDMARDs, biological original synthetic disease-modifying antirheumatic drugs; CRP, C reactive protein; csDMARDs, conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drugs; DAS, disease activity score; DKK-1, dickkopf-1; DXA, Dual-energy X-ray absorptiometry; ESR, erythrocyte sedimentation rate; HAQ, Health Assessment Questionnaire; JSN, joint space narrowing; NSAIDs, nonsteroidal anti-inflammatory drugs; OPG, osteoprotegerin; PTH, parathormone; RANKL, receptor activator of nuclear factor- κ B ligand; RF, rheumatoid factor; SD, standard deviation; SHS, Sharp/van der Heijde score; SJC, swollen joint count; SSRIs, specific serotonin reuptake inhibitors; TJC, tender joint count; TNF α , tumor necrosis factor alpha; WHO, World Health Organization.

Supplemental table 2. Genotypic distributions for each LRP5 polymorphism in Rheumatoid Arthritis patients.


LRP5 SNPs	LRP5 genotypes		
p.V667M (rs4988321; c.1999G>A)	GG; 184 (88.5)	AG; 23 (11.1)	AA; 1 (0.005)
p.N740N (rs2306862; c.2220C>T)	CC; 143 (68.8)	TC; 56 (26.9)	TT; 9 (4.3)
p.A1330V (rs3736228; c.3989C>T)	CC; 150 (72.1)	TC; 51 (24.5)	TT; 7 (3.4)

Results are presented as n (%). A, alanine; AA, adenine-adenine; AG, adenine-guanine; CC, cytosine-cytosine; GG, guanine-guanine; LRP5, lipoprotein receptor-related protein-5; M, methionine; N, asparagine; SNP, single nucleotide polymorphism; TC, thymine-cytosine; TT, thymine-thymine; V, valine.

3.2. Serum serotonin levels and bone in rheumatoid arthritis patients

Bernardes M, Vieira T, Lucas R, Pereira J, Costa L, Simões-Ventura F, Martins MJ. Serum serotonin levels and bone in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol Int* 2017 37(11): 1891-8. doi: 10.1007/s00296-017-3836-9.

Serum serotonin levels and bone in rheumatoid arthritis patients

Miguel Bernardes^{1,2}  · Tiago Vieira³ · Raquel Lucas^{4,5} · Jorge Pereira³ ·
Lúcia Costa¹ · Francisco Simões-Ventura⁶ · Maria João Martins^{7,8}

Received: 1 May 2017 / Accepted: 23 September 2017
© Springer-Verlag GmbH Germany 2017

Abstract In rheumatoid arthritis (RA), a disease characterized by bone loss, increased levels of serotonin have been reported. Recent studies have demonstrated a role for circulating serotonin as a regulator of osteoblastogenesis, inhibiting bone formation. Thus, we measured serum serotonin levels (SSL) in a Portuguese sample of 205 RA patients and related these to anthropometric variables, disease parameters, serum bone biomarkers, and bone mineral density (BMD) assessed by dual-energy X-ray absorptiometry at several sites (total proximal femur, lumbar spine, left hand, and left second proximal phalange). SSL were inversely associated with body mass index (BMI) in RA women ($r = -0.218$; $p = 0.005$), independent of exposure to biologics and/or bisphosphonates. Among biologic naïves,

there was an inverse association between SSL and osteoprotegerin in RA women ($r = -0.260$; $p = 0.022$). Serum β -CTX and dickkopf-1 were strongly associated with SSL in RA men not treated with bisphosphonates ($r = 0.590$; $p < 0.001$ / $r = 0.387$; $p = 0.031$, respectively). There was also an inverse association between SSL and sclerostin in RA men ($r = -0.374$; $p < 0.05$), stronger among biologic naïve or bisphosphonates-unexposed RA men. In crude models, SSL presented as a significant negative predictor of total proximal femur BMD in RA women as well as in postmenopausal RA women. After adjustment for BMI, disease duration, and years of menopause, SSL remained a significant negative predictor of total proximal femur BMD only in postmenopausal RA women. Our data reinforce a role, despite weak, for circulating serotonin in regulating bone mass in RA patients, with some differences in terms of gender and anatomical sites.

Electronic supplementary material The online version of this article (<http://doi.org/10.1007/s00296-017-3836-9>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Miguel Bernardes
mbernardes09@gmail.com

Tiago Vieira
tiago.sampaio.vieira@gmail.com

Raquel Lucas
rlucas@med.up.pt

Jorge Pereira
jorgepgpereira@gmail.com

Lúcia Costa
dias.costa.ml@gmail.com

Francisco Simões-Ventura
fsventura@zonmail.pt

Maria João Martins
mmartins@med.up.pt

¹ Department of Rheumatology, São João Hospital Center,
Alameda Prof. Hernâni Monteiro, 4200-319 Porto, Portugal

² Medicine Department, Faculty of Medicine, University
of Porto, Porto, Portugal

³ Department of Nuclear Medicine, São João Hospital Center,
Porto, Portugal

⁴ EPIUnit-Institute of Public Health, University of Porto,
Porto, Portugal

⁵ Department of Clinical Epidemiology, Predictive Medicine
and Public Health, Faculty of Medicine, University of Porto,
Porto, Portugal

⁶ Faculty of Medicine, University of Porto (FMUP), Porto,
Portugal

⁷ Unit of Biochemistry, Department of Biomedicine, Faculty
of Medicine, University of Porto, Porto, Portugal

⁸ Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (i3s),
University of Porto, Porto, Portugal

Keywords DXA · Biochemical markers of bone turnover · Wnt/ β -catenin/LRPs · Other diseases and disorders of/related to bone · Osteoimmunology

Introduction

Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5), a co-receptor for Wnt proteins, is known to have an important role in skeletal metabolism. Osteoporosis pseudoglioma (OPPG) syndrome [1, 2] and inherited high bone mass (HBM) phenotypes are caused by LRP5 mutations [1, 3–6].

On the other hand, it was suggested that LRP5 regulates bone mass in part by modulating circulating levels of serotonin [1, 6–8]. OPPG patients present with several degrees of increase in circulating serotonin levels [7, 9–11] and Danish families with different HBM-causing LRP5 mutations exhibit significantly lower levels of platelet poor plasma (PPP) serotonin than controls [1, 12, 13]. Further clinical evidence was provided by a cross-sectional study in women from a population-based sample in whom serum serotonin levels are inversely correlated with bone mass [1, 14]. Phenylketonuria, a disease in which an increase in circulating serotonin levels occurs, is also associated with low bone mass [9, 15, 16].

In animal models, serotonin was shown to directly suppress osteoblast function [7, 17, 18] as well as to lead to cyclin genes repression [7, 19–21]. Serotonin can be reduced by inhibiting tryptophan hydroxylase 1 (Tph1) expression, the rate-limiting enzyme in serotonin synthesis [1, 7, 22].

Serotonin was also shown to be involved in the control of the anabolic response of appendicular skeleton to physical activity [23]. In the condition of reduced physical activity, tryptophan-free diet-treated rats exhibit a significant reduction of bone formation and dietary tryptophan supplementation improves bone mass by increasing osteoblast activity [23].

In contrast to the data summarized above, Cui and colleagues provided evidence that serotonin does not interfere with the LRP5 effects on bone, but instead, LRP5 acts locally in the skeleton: (a) activation of a knock-in mutant LRP5 allele in the appendicular skeleton increases bone mass only in the limbs but not in the spine; (b) intestine-specific activation of HBM-causing LRP5 mutations has no effect on bone mass and measured serum serotonin levels are similar among HBM LRP5 knock-in, knock-out, or wild-type mice [1, 24]. Chang and colleagues also found similar serum serotonin levels in LRP5^{-/-} mice and controls [1, 8].

In individuals from 2 kindreds with HBM-causing LRP5 mutations (G171V [13], N198S [2]) and using two different methodologies (ELISA and HPLC), no differences occur in serotonin levels in the PPP, serum, and platelet pellet (PP) between affected individuals and

controls [1]. In carcinoid syndrome, a disease in which an increase in circulating serotonin levels is observed, there is neither association with lower bone density, poorer bone structure, nor lower bone formation markers [25].

In patients treated with selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) [26–29], the previous studies show increased hip and wrist fractures [26, 27, 30, 31] and decreased bone mineral density (BMD) in femoral neck and total hip. In SSRI users, the association of compromised bone with low serum serotonin levels [26, 32–34] apparently contradicts the hypothesis of an inhibitory effect of circulating serotonin on bone formation as previously exposed [7, 26, 35]. One possible explanation is that SSRIs inhibit directly the serotonin transporter located on bone cell membranes, increasing local serotonin levels by reducing its removal from the bone cell microenvironment, despite the decrease in the circulating serotonin levels [19].

In rheumatoid arthritis (RA) patients, increased levels of serotonin versus healthy subjects have been reported, which may contribute to some extent to the excessive bone loss in this disease [36]. Recently, Klavdianou and colleagues confirmed these findings and showed that Ankylosing Spondylitis (AS) patients have lower serotonin levels than RA patients and healthy controls and that AS patients under anti-tumor necrosis factor alpha (TNF α) treatment exhibit even lower serotonin levels [37].

In view of these conflicting data, we revisited the relationship between bone mass and serum serotonin levels among a Portuguese cohort of RA patients to provide further evidence.

Patients and methods

Rheumatoid arthritis patients

During a 6-month period, RA patients, classified according to the American College of Rheumatology 1987 criteria, were consecutively included in the study protocol. Informed consent was obtained from each patient. The study protocol was approved by the local Ethical Committee in accordance with the principles of the 1964 Declaration of Helsinki [38].

Through a Rheumatology appointment, all subjects underwent clinical assessment using the Portuguese version of the Stanford Health Assessment Questionnaire (HAQ) and the disease activity score (DAS28) four variables (4v), to determine the RA disease state [39]. All past medication since admission to the outpatient clinic and ongoing medication were recorded. The smoking status (past and current) was registered and the body mass index (BMI) calculated.

Laboratory measurements

Between 08:00 and 10:00 h in the morning, a fasting blood sample was collected to evaluate C-reactive protein (CRP), erythrocyte sedimentation rate (ESR), rheumatoid factor (RF) and anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) antibodies, creatinine, calcium, phosphorus, alkaline phosphatase, 25(OH) vitamin D3, intact parathormone (PTH), osteocalcin, β -isomerised carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen (β -CTX), osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL), dickkopf-1 (DKK-1), sclerostin, and serotonin levels. RA patients followed dietary restriction [of the following foods and drinks: tea, coffee, chocolate, avocados, bananas, tomatoes, plums, walnuts, eggplants, pineapples, citrus, and food with vanilla (namely candy from pastry shops)] and were asked not to take paracetamol or cough medicines for 48 h before and on the day of the blood sampling. Serum samples were stored at -70°C for OPG, RANKL, DKK-1, sclerostin, and serotonin measurements by ELISA. All the specimens were measured in duplicate, according to the manufacturer's instructions and then averaged. OPG, DKK-1, RANKL, and sclerostin were determined as previously described [40]. Serotonin was measured using a kit from Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG (Nordhorn, Germany); the intra- and inter-assay coefficients of variation were 3.9–5.4 and 6.0%, respectively.

Bone mineral density measurement

Dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) (LUNAR Expert XL) was used to measure BMD at total left proximal femur, lumbar spine (L1–L4), left hand, and left second proximal phalange, according to a standardised procedure for each site. L1–L4 postero-anterior view was the spine region of interest for BMD measurements; all evaluable vertebrae were used and only were excluded those vertebrae affected by local structural change or artifact until a maximum of two. The entire hand (including the wrist bones but excluding the ends of the radius and ulna) was included in the analysis and all measurements were made using the “Hand” software package on GE Lunar scanners. One technician performed all DXA scans and the coefficients of variation of repeated measurements ranged from 0.9 to 1.5% for BMD at the different anatomical locations.

Statistical analyses

Qualitative data are described as absolute counts and proportions and quantitative data as mean and standard deviation. Pearson correlation coefficients were estimated to assess pairwise correlations between serum serotonin levels and the anthropometric, disease, laboratory, and DXA parameters

evaluated here. The magnitude of associations between serum serotonin levels and the distinct BMD outputs were estimated from linear regression coefficients and respective 95% confidence intervals. Associations are presented as crude measures and adjusted to BMI, disease duration, years since menopause and serotonin levels to reduce confounding by those. All analyses were two-sided and p values < 0.05 were considered statistically significant. Statistical analyses were performed using the STATA[®] software (V.11, Stata-corp, College Station, Texas, USA).

Results

Patient's characteristics

Two hundred and five patients with RA were included [women represented 80.5% ($n = 165$) of the entire sample], with a mean (SD) age and BMI of 54 [11] years and 27.1 (4.8) kg/m^2 , respectively. The duration of the disease, measured from the date of diagnosis, was 14 [10] years. In terms of medications that potentially could affect the circulating levels of serotonin, we can refer the use of beta-blockers in 18 (9%) patients and specific serotonin reuptake inhibitors in 13 (6%).

The majority of the patients were seropositive for RF ($n = 119$, 58%) and anti-CCP ($n = 163$, 80%) antibodies.

The mean (SD) DAS28 (4v) and HAQ were 4.282 (1.360) and 1.250 (0.710), respectively. DAS28 remission criteria were present in 19 (9%) patients.

One hundred and three patients (50%) were under biological therapy, mainly TNF- α blockers (41%), and 171 (83%) under non-biological disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs). Daily prednisone dosage was 5.126 (3.900) mg, with the mean duration of the corticotherapy being 11 [9] years. Twenty-eight (14%) patients were ever-smokers.

One hundred patients (49%) were osteopenic or osteoporotic, 68 (33%) under bisphosphonates and 43 (21%) under vitamin D supplements. None of the 98 postmenopausal women (59%, among female patients) were under selective estrogen receptor modulators or taking hormone therapy (oral or transdermal estrogen preparations with or without a progestin). We defined menopause as the absence of menses for greater than 1 year.

Distributions of clinical and laboratory variables are shown in Supplemental Table 1.

Relation of circulating serotonin with anthropometric, DXA, clinical, and laboratory parameters

Serum serotonin levels were inversely associated with BMI values in the whole sample ($r = -0.220$; $p = 0.002$) and in RA women ($r = -0.218$; $p = 0.005$) (Supplemental

Table 1 Linear regression coefficients for the crude and adjusted associations between serum serotonin level and bone mineral density outcomes in rheumatoid arthritis patients in different skeletal regions

Outcome	Group	Predictors	β β^a	<i>p</i> value	95% CI for β	
					Lower	Upper
Proximal femur bmd (g/cm ²)	Women	Serotonin	− 0.308	0.008	− 0.5332	− 0.082
	Pre menopausal women	Serotonin	− 0.340	0.091	− 0.736	0.056
	Post menopausal women	Serotonin	− 0.396	0.003	− 0.649	− 0.143
			− 0.303 ^a	0.005 ^a	− 0.514 ^a	− 0.092 ^a
	Men	Serotonin	− 0.104	0.642	− 0.554	0.347
			− 0.213 ^a	0.390 ^a	− 0.713 ^a	0.286 ^a
Lumbar spine bmd (g/cm ²)	Women	Serotonin	− 0.144	0.305	− 0.419	0.132
	Post menopausal women	Serotonin	− 0.220 ^a	0.080 ^a	− 0.446 ^a	0.027 ^a
	Men	Serotonin	− 0.177	0.436	− 0.633	0.279
			− 0.246 ^a	0.341 ^a	− 0.765 ^a	0.273 ^a
Left hand bmd (g/cm ²)	Women	Serotonin	− 0.075	0.212	− 0.184	0.027
	Post menopausal women	Serotonin	− 0.079 ^a	0.143 ^a	− 0.184 ^a	0.027 ^a
	Men	Serotonin	− 0.067	0.528	− 0.280	0.146
			− 0.119 ^a	0.320 ^a	− 0.360 ^a	0.122 ^a
Second left proximal phalange bmd (g/cm ²)	Women	Serotonin	− 0.038	0.450	− 0.138	0.062
	Post menopausal women	Serotonin	− 0.052 ^a	0.277 ^a	− 0.147 ^a	0.042 ^a
	Men	Serotonin	0.022	0.814	− 0.167	0.210
			− 0.022 ^a	0.832 ^a	− 0.233 ^a	0.189 ^a

^aAdjusted for BMI, disease duration, serum serotonin levels, and years of menopause (the later only for the postmenopausal women subgroup) in a multivariable model. β and 95% CI for β are $\times 1000$

Table 2). The same association was found in RA patients and RA women neither treated with biologics ($r = -0.278$; $p = 0.005$ / $r = -0.278$; $p = 0.014$, respectively) nor with bisphosphonates ($r = -0.226$; $p = 0.008$ / $r = -0.221$; $p = 0.023$, respectively), nor with both ($r = -0.332$; $p = 0.009$ / $r = -0.335$; $p = 0.025$, respectively) (data not shown). In addition, serum serotonin levels were not associated with current age.

In the whole sample, no associations were found between the serum levels of bone metabolism biomarkers and serotonin, with the exception, although weak, of intact PTH (Supplemental Table 2). The levels of the bone resorption marker β -CTX were positively associated with serum serotonin levels in RA men ($r = 0.334$; $p = 0.035$) (Supplemental Table 2) and RA men not treated with bisphosphonates ($r = 0.590$; $p < 0.001$) (data not shown). Serum levels of DKK-1 and serotonin were also positively associated in RA men not treated with bisphosphonates ($r = 0.387$; $p = 0.031$) (data not shown). Among biologic naïves, there was also an inverse but weak association between serum levels of serotonin and OPG in RA patients and RA women ($r = -0.224$; $p = 0.024$ / $r = -0.260$; $p = 0.022$, respectively) (data not shown). Serum levels of serotonin and sclerostin were negatively associated in RA men ($r = -0.374$; $p = 0.021$) (Supplemental Table 2) and, particularly, in RA men neither treated with biologics ($r = -0.457$; $p = 0.028$) nor with bisphosphonates ($r = -0.393$; $p = 0.035$) (data not shown).

In the whole sample, no associations were found between serotonin levels and disease-related parameters (RA disease duration, years under corticosteroids, prednisolone daily dose, months under biologicals, months under DMARDs, ESR, CRP, DAS28(4v), swollen joint count, tender joint count, global health, and HAQ) (Supplemental Table 2). Years of RA disease duration and years under corticosteroids were inversely associated with serum serotonin levels in RA men ($r = -0.340$; $p = 0.032$ / $r = -0.326$; $p = 0.004$, respectively) (Supplemental Table 2). A negative association between years of RA disease duration and serum serotonin levels was also demonstrated for RA men not treated with bisphosphonates ($r = -0.432$; $p = 0.015$) (data not shown).

Inverse correlations were also found between serum serotonin levels and total proximal femur BMD values in the whole sample and in RA patients not treated with bisphosphonates [$r = -0.195$; $p = 0.010$ (Supplemental Table 2)/ $r = -0.231$; $p = 0.013$ (data not shown), respectively], and similarly in RA women and RA women not treated with bisphosphonates [$r = -0.226$; $p = 0.008$ (Supplemental Table 2)/ $r = -0.240$; $p = 0.023$ (data not shown), respectively]. No associations were found between lumbar spine (L1–L4), left hand, and left second proximal phalange BMD values and serum serotonin levels in any of the groups (Supplemental Table 2). Nevertheless, when we restricted the analysis to biologic-naïve RA patients not treated with bisphosphonates, there was an inverse and weak

association between serum serotonin levels and lumbar spine BMD ($r = -0.277$; $p = 0.046$) at the threshold of statistical significance (data not shown).

In crude analysis, serum serotonin levels presented as a significant negative predictor of total proximal femur BMD values in female RA patients as well as in postmenopausal RA women (Table 1 and Fig. 1). Serum serotonin level was not a significant predictor of lumbar spine, left hand, and left second proximal phalange BMD values in RA patients (Table 1).

Since BMI, disease duration, and menopause could represent additional confounders, we computed adjusted models with DXA parameters as the dependent variables and BMI, years of disease duration, years since menopause and serum serotonin levels as covariates. Thus, for total proximal femur BMD in postmenopausal RA women, serum serotonin level remained a significant negative predictor even after BMI, disease duration, and years since menopause had been accounted for (Table 1). Furthermore, when we also added steroid, vitamin D, and bisphosphonates usage to the model, serum serotonin level remained negatively associated with total proximal femur BMD in postmenopausal RA women (data not shown), although we must be cautious and question the validity of this last model with the inclusion of so many covariates.

In the whole sample, no significant associations were found between the serum bone biomarkers levels and BMD values, with the exceptions, although weak, of alkaline phosphatase and left hand BMD ($r = -0.196$; $p = 0.012$), Dkk-1 and lumbar spine BMD ($r = -0.140$; $p = 0.050$), OPG and total proximal femur BMD ($r = -0.155$; $p = 0.037$), OPG and left hand BMD ($r = -0.171$; $p = 0.030$) (data not shown).

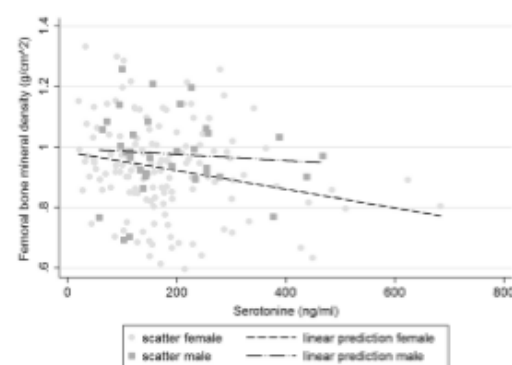


Fig. 1 Scatter plot and linear predictions of proximal femur bone mineral density according to serum serotonin levels in women and men with rheumatoid arthritis

Discussion

In our study, we demonstrate an inverse, despite weak, association between serum serotonin levels and total proximal femur BMD in postmenopausal RA women. This association was independent of BMI, disease duration, and years of menopause. Serum serotonin levels were also negatively correlated with proximal femur BMD in the subgroup of RA women not treated with bisphosphonates. This relation was not verified for premenopausal women or men, and serum serotonin level was not a significant predictor of lumbar spine, left hand, and left second proximal phalange BMD in RA patients. However, among biologic-naïve RA patients not treated with bisphosphonates, serum serotonin levels were also negatively correlated with lumbar spine BMD. Although anti-TNF α blockers may affect serotonin levels and BMD, simultaneously, and 40% of our RA patients were under these agents, serum serotonin levels did not correlate with the duration of biological treatment.

In our sample, serum serotonin levels (mean \pm SD ng/mL, 179.3 ± 108.5) were similar compared with healthy subjects (mean \pm SEM ng/mL, 177.4 ± 24.58) and lower compared with other RA patients (mean \pm SEM ng/mL, 244.8 ± 37.5) from the Klavdianou study [37]. However, in this last study, there was a lack of control for dietary intake of tryptophan as in ours, and for serotonin measurement, they used a radioimmunoassay, while we used ELISA. The ideal situation would have been the inclusion of a healthy control group to corroborate Klavdianou findings of higher serum serotonin levels in RA patients versus healthy subjects, and this fact is a weakness of our study.

Our results are in accordance with those of Mödter and colleagues, who [14, 19] found negative associations between serum serotonin levels and femur neck total, trabecular volumetric BMD, and trabecular thickness in 275 women. They also found an inverse association with femur neck trabecular volumetric BMD in the premenopausal subgroup ($n = 185$) [14, 19]. Although these associations were statistically weaker than ours, unlike in our study, they did not control for dietary intake of tryptophan in the subjects submitted to serotonin measurements. Frost and colleagues have also reported an inverse association between serum serotonin and cortical thickness among 19 controls [13].

On the other hand, our study appears to contradict that of Wang and colleagues, who also investigated associations between serum serotonin and DXA and quantitative computed tomography bone traits in a Finnish sample (235 young women, 121 premenopausal women, 124 postmenopausal women, and 168 men) [26]. In postmenopausal women, they observed that serotonin was positively correlated with whole body and femur areal BMD, as well as with distal radius bone mineral content and volumetric BMD, and that these findings remained significant after adjustment for

weight [26]. In another study, Kim and colleagues reported no significant association between serotonin and lumbar or femoral BMD in 80 postmenopausal women, not on hormone therapy [41]. The discrepancy between the obtained results in the several population studies can be explained by differences in terms of sample size and dietary habits, associated with lack of diet control prior to the blood draw. In fact, serum serotonin level is deeply affected by tryptophan intake [26, 41, 42].

In our study, serum serotonin levels were inversely associated with BMI among RA women, independent of the co-treatment with bisphosphonates and/or biologics. However, this trend has already been described [14, 43–47]. Mödder and colleagues revealed that fat mass was the major driver of this association [14]. In addition, Wang and colleagues observed that serum serotonin was negatively correlated with weight, BMI, lean, and fat mass in women but positively with height and lean mass in men [26]. In line with this evidence, it has been suggested that serotonin plays an important role in the regulation of appetite, causing a reduction in the caloric intake. Fluoxetine, an SSRI, has been shown to result in significantly greater weight loss than placebo treatment [14, 48–51]. In counterpoint, blocking serotonin synthesis resulted not only in the prevention of serotonin-induced hypophagia, but also in an increased food intake [14, 52].

Regarding the proposed mechanisms of action of serotonin at bone metabolism, Yadav and colleagues [7, 14] demonstrated that gut-derived serotonin principally regulates bone formation *in vivo* and osteoblast proliferation *in vitro*, with no clear effect on bone resorption *in vivo*. However, these findings were in contrast with earlier studies, revealing that serotonin can enhance osteoclast differentiation *in vitro* [14, 53]. Positive associations between serum serotonin and aminoterminal propeptide of procollagen I (PINP) levels as well as between serum serotonin, CTX levels, and osteocalcin have also been reported in different subgroups [13, 14, 25, 26]. By contrast, Kim and colleagues observed that plasma serotonin level was correlated with serum total alkaline phosphatase but not with serum osteocalcin or CTX levels [41].

Interestingly, in our study and in RA men, we found a positive association of serum serotonin levels with β -CTX and a negative one with sclerostin, independent of the co-treatment with bisphosphonates and biologics/bisphosphonates, respectively. DKK-1 and serum serotonin levels were also positively associated in RA men not treated with bisphosphonates. Among biologic-naïves RA women, there was also an inverse association between serum serotonin levels and OPG. Our findings reflect a higher level of complexity in what concerns to serotonin effects on bone metabolism in humans, which seems to be not exclusively restricted to bone formation.

Although we know the importance of hormone replacement therapy in bone, in our study, it was not possible to evaluate the impact of such therapy, because none of our postmenopausal RA women were under hormone therapy. Meanwhile, some studies tried to elucidate whether serotonin may modulate the skeletal effects of estrogen on bone. Kim and colleagues revealed that the changes of circulating serotonin levels after 3 months of initiating hormone therapy did not associate with lumbar or femoral BMD variations determined after 1 year under hormone therapy, suggesting that the estrogen bone-preserving effect is independent of the peripheral serotonin actions [41]. In addition, the cross-sectional study by Mödder and colleagues did not detect a significant difference in serum serotonin level among postmenopausal women treated or not treated with estrogen replacement therapy [14, 41]. In another report of the same group and after a 4-month period of study, plasma levels of serotonin did not differ between controls and women treated with transdermal estradiol, either in peripheral or bone-marrow (BM) plasma samples [41, 54]. Moreover, the plasma concentration of peripheral serotonin was significantly higher than that of BM serotonin. We should note that serotonin concentrations may actually be very different, depending on the type of sample used, and this is, undoubtedly, an important issue to take into account when we compare several population studies.

Circulating serotonin derived mainly from the gastrointestinal enterochromaffin cells is rapidly taken up by platelets [14, 27, 55]. During serum collection, the platelets-stored serotonin is released; consequently, serum serotonin levels are approximately 100-fold higher than in PPP [14, 27, 36]. Nowadays, it is still unclear which is the best “index” of gut serotonin production: serum or PPP serotonin levels. Thus, it is possible that the weak associations we noted may have been different if we had used PPP instead of serum for our measurements. In addition, serotonin may be released from platelets in blood samples when the concentration of anticoagulant is inadequate [41, 56, 57]. In a previous small study, the recommended optimum concentration of EDTA2K was 7.4–9.9 mmol/L [41, 56], but we did not evaluate the concentration of EDTA2K in our collection samples.

Conclusion

Our study does provide support for a possible, despite weak, physiologic role for circulating serotonin levels in regulating femoral bone mineral density in postmenopausal women with RA, but not in premenopausal women or men with RA. The fact that we demonstrated that circulating serotonin is an independent predictor of femoral BMD in a disease that, by itself or by its treatments, largely influences the bone mass, is of some importance. These findings also suggest

that gender and, eventually, hormone status in women may contribute to the mechanism behind this link. In our sample, there is also a weak connection between circulating serotonin levels and bone metabolism markers. The clinical significance of these weak associations remains unclear. However, these data reinforce recent findings indicating that increased serotonin signalling has negative effects on bone. Further studies in RA cohorts are needed to validate our findings, elucidating the potential role of serotonin in bone metabolism regulation in humans.

Acknowledgements Authors' roles: MB conceived the idea of the study, designed the study, coordinated the project, participated in patient recruitment and in data acquisition, drafted the manuscript, and takes responsibility for the integrity of the data analysis. RL performed the statistical analysis, revised the manuscript, and takes responsibility for the integrity of the data analysis. TV and JP performed DXA evaluations and approved the final version of the manuscript. LC participated in patient recruitment and approved the final version of the manuscript. FSV coordinated the project, participated in patient recruitment and revised the manuscript. MJM conceived the idea of the study, coordinated the experimental work (ELISA), assisted in manuscript drafting, and takes responsibility for the integrity of the data analysis. The authors wish to acknowledge Associação Nacional de Reumatologia for the doctoral grant, Conceição Gonçalves (MSc) from the Laboratório Nobre in the Faculty of Medicine of the University of Porto, the nursing Service of Rheumatology Day Hospital of São João Hospital Center, and the clinicians from the Rheumatology Department of São João Hospital Center, especially Alexandra Bernardo (M.D.) and Sofia Pimenta (M.D.).

Funding Associação Nacional de Reumatologia, the study sponsor, had no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of the data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Ethical approval The study protocol was approved by the local Ethical Committee, *Comissão de Ética para a Saúde do Centro Hospitalar de São João do Porto*, in accordance with the principles of the 1964 Declaration of Helsinki [38].

References

- Lee GS, Simpson C, Sun BH, Yao C, Foer D, Sullivan B et al (2014) Measurement of plasma, serum, and platelet serotonin in individuals with high bone mass and mutations in LRP5. *J Bone Miner Res* 29:976–981
- Gong Y, Slec RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM et al (2001) LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 107:513–523
- Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA et al (2002) High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* 346:1513–1521
- Van Wesenbeeck L, Cleiren E, Gram J, Beals RK, Benichou O, Scopelliti D et al (2003) Six novel missense mutations in the LDL receptor-related protein 5 (LRP5) gene in different conditions with an increased bone density. *Am J Hum Genet* 72:763–771
- Whyte MP, Reinus WH, Mumm S (2004) High-bone-mass disease and LRP5. *N Engl J Med* 350:2096–2099 (author reply 9)
- Goltzman D (2011) LRP5, serotonin, and bone: complexity, contradictions, and conundrums. *J Bone Miner Res* 26:1997–2001
- Yadav VK, Ryu JH, Suda N, Tanaka KF, Gingrich JA, Schutz G et al (2008) Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. *Cell* 135:825–837
- Chang MK, Kramer I, Keller H, Gooi JH, Collett C, Jenkins D et al (2014) Reversing LRP5-dependent osteoporosis and SOST deficiency-induced sclerosing bone disorders by altering WNT signaling activity. *J Bone Miner Res* 29:29–42
- Karsenty G, Yadav VK (2011) Regulation of bone mass by serotonin: molecular biology and therapeutic implications. *Annu Rev Med* 62:323–331
- Yadav VK, Arantes HP, Barros ER, Lazaretti-Castro M, Ducy P (2010) Genetic analysis of Lrp5 function in osteoblast progenitors. *Calcif Tissue Int* 86:382–388
- Saarela A, Saukkonen T, Kivela T, Lahtinen U, Laine C, Somer M et al (2010) Low density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) mutations and osteoporosis, impaired glucose metabolism and hypercholesterolaemia. *Clin Endocrinol* 72:481–488 (Oxf)
- Frost M, Andersen TE, Yadav V, Brixen K, Karsenty G, Kassem M (2010) Patients with high-bone-mass phenotype owing to Lrp5-T2531 mutation have low plasma levels of serotonin. *J Bone Miner Res* 25:673–675
- Frost M, Andersen T, Gossiel F, Hansen S, Bollerslev J, van Hul W et al (2011) Levels of serotonin, sclerostin, bone turnover markers as well as bone density and microarchitecture in patients with high-bone-mass phenotype due to a mutation in Lrp5. *J Bone Miner Res* 26:1721–1728
- Modder UI, Achenbach SJ, Amin S, Riggs BL, Melton LJ 3rd, Khosla S (2010) Relation of serum serotonin levels to bone density and structural parameters in women. *J Bone Miner Res* 25:415–422
- Giovannini M, Valsasina R, Longhi R, Cesura AM, Galva MD, Riva E et al (1988) Serotonin and noradrenaline concentrations and serotonin uptake in platelets from hyperphenylalaninaemic patients. *J Inher Metab Dis* 11:285–290
- Modan-Moses D, Vered I, Schwartz G, Anikster Y, Abraham S, Segev R et al (2007) Peak bone mass in patients with phenylketonuria. *J Inher Metab Dis* 30:202–208
- Gustafsson BI, Thommesen L, Stunes AK, Tommeras K, Westbroek I, Waldum HL et al (2006) Serotonin and fluoxetine modulate bone cell function in vitro. *J Cell Biochem* 98:139–151
- Galli C, Macaluso G, Passeri G (2013) Serotonin: a novel bone mass controller may have implications for alveolar bone. *J Negat Results Biomed* 12:12
- Bliziotes M (2010) Update in serotonin and bone. *J Clin Endocrinol Metab* 95:4124–4132
- Yadav VK, Ducy P (2010) Lrp5 and bone formation: a serotonin-dependent pathway. *Ann N Y Acad Sci* 1192:103–109
- Kode A, Mosialou I, Silva BC, Rached MT, Zhou B, Wang J et al (2012) FOXO1 orchestrates the bone-suppressing function of gut-derived serotonin. *J Clin Invest* 122:3490–3503
- Tamai K, Zeng X, Liu C, Zhang X, Harada Y, Chang Z et al (2004) A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol Cell* 13:149–156
- Sibilia V, Pagani F, Dieci E, Mrak E, Marchese M, Zarattini G et al (2013) Dietary tryptophan manipulation reveals a central role for serotonin in the anabolic response of appendicular skeleton to physical activity in rats. *Endocrine* 44:790–802
- Cui Y, Niziolek PJ, MacDonald BT, Zylstra CR, Alenina N, Robinson DR et al (2011) Lrp5 functions in bone to regulate bone mass. *Nat Med* 17:684–691

25. Walsh JS, Newell-Price JD, DeBono M, Adaway J, Keevil B, Eastell R (2013) Circulating serotonin and bone density, structure, and turnover in carcinoid syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 98:2902–2907
26. Wang Q, Chen D, Nicholson P, Cheng S, Alen M, Mao L et al (2014) The associations of serum serotonin with bone traits are age- and gender-specific. *PLoS ONE* 9:e109028
27. Richards JB, Papaioannou A, Adachi JD, Joseph L, Whitson HE, Prior JC et al (2007) Effect of selective serotonin reuptake inhibitors on the risk of fracture. *Arch Intern Med* 167:188–194
28. Diem SJ, Blackwell TL, Stone KL, Yaffe K, Haney EM, Bliziotes MM et al (2007) Use of antidepressants and rates of hip bone loss in older women: the study of osteoporotic fractures. *Arch Intern Med* 167:1240–1245
29. Williams LJ, Henry MJ, Berk M, Dodd S, Jacka FN, Kotowicz MA et al (2008) Selective serotonin reuptake inhibitor use and bone mineral density in women with a history of depression. *Int Clin Psychopharmacol* 23:84–87
30. Liu B, Anderson G, Mittmann N, To T, Axcell T, Shear N (1998) Use of selective serotonin-reuptake inhibitors or tricyclic antidepressants and risk of hip fractures in elderly people. *Lancet* 351:1303–1307
31. Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L (2006) Anxiolytics, sedatives, antidepressants, neuroleptics and the risk of fracture. *Osteoporos Int* 17:807–816
32. Karege F, Widmer J, Bovier P, Gaillard JM (1994) Platelet serotonin and plasma tryptophan in depressed patients: effect of drug treatment and clinical outcome. *Neuropsychopharmacology* 10:207–214
33. Rothman RB, Zolkowska D, Baumann MH (2008) Serotonin (5-HT) transporter ligands affect plasma 5-HT in rats. *Ann N Y Acad Sci* 1139:268–284
34. Zolkowska D, Baumann MH, Rothman RB (2008) Chronic fenfluramine administration increases plasma serotonin (5-hydroxytryptamine) to nontoxic levels. *J Pharmacol Exp Ther* 324:791–797
35. Yadav VK, Balaji S, Suresh PS, Liu XS, Lu X, Li Z et al (2010) Pharmacological inhibition of gut-derived serotonin synthesis is a potential bone anabolic treatment for osteoporosis. *Nat Med* 16:308–312
36. Kopp S, Alstergren P (2002) Blood serotonin and joint pain in seropositive versus seronegative rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm* 11:211–217
37. Klavdianou K, Liassos SN, Papachristou DJ, Theocharis G, Sirinian C, Kottorou A et al (2016) Decreased serotonin levels and serotonin-mediated osteoblastic inhibitory signaling in patients with ankylosing spondylitis. *J Bone Miner Res* 31:630–639
38. Reynolds T (2000) Declaration of Helsinki revised. *J Natl Cancer Inst* 92:1801–1803
39. Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL (1995) Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 38:44–48
40. Bernardes M, Vieira TS, Martins MJ, Lucas R, Costa L, Pereira JG et al (2017) Myocardial Perfusion in Rheumatoid Arthritis Patients: Associations with Traditional Risk Factors and Novel Biomarkers. *Biomed Res Int* 2017:6509754
41. Kim HY, Park MH, Yoon HK, Han KO (2012) The changes in plasma serotonin levels after hormone therapy and their relationship with estrogen responsiveness on bone in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 97:1986–1994
42. Gershon MD, Tack J (2007) The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology* 132:397–414
43. Blundell JE (1984) Serotonin and appetite. *Neuropharmacology* 23:1537–1551
44. Blundell JE (1986) Serotonin manipulations and the structure of feeding behaviour. *Appetite* 7(Suppl):39–56
45. Curzon G (1990) Serotonin and appetite. *Ann N Y Acad Sci* 600:521–530 (discussion 30–1)
46. Leibowitz SF, Weiss GF, Suh JS (1990) Medial hypothalamic nuclei mediate serotonin's inhibitory effect on feeding behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 37:735–742
47. Simansky KJ (1996) Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. *Behav Brain Res* 73:37–42
48. McGuirk J, Silverstone T (1990) The effect of the 5-HT re-uptake inhibitor fluoxetine on food intake and body weight in healthy male subjects. *Int J Obes* 14:361–372
49. Pijl H, Koppeschaar HP, Willekens FL, Op de Kamp I, Veldhuis HD, Meinders AE (1991) Effect of serotonin re-uptake inhibition by fluoxetine on body weight and spontaneous food choice in obesity. *Int J Obes* 15:237–242
50. Lawton CL, Wales JK, Hill AJ, Blundell JE (1995) Serotonergic manipulation, meal-induced satiety and eating pattern: effect of fluoxetine in obese female subjects. *Obes Res* 3:345–356
51. Ward AS, Comer SD, Haney M, Fischman MW, Foltin RW (1999) Fluoxetine-maintained obese humans: effect on food intake and body weight. *Physiol Behav* 66:815–821
52. MacKenzie RG, Hoebel BG, Ducret RP, Trulsson ME (1979) Hyperphagia following intraventricular p-chlorophenylalanine-, leucine- or tryptophan-methyl esters: lack of correlation with whole brain serotonin levels. *Pharmacol Biochem Behav* 10:951–955
53. Battaglini R, Fu J, Spate U, Ersoy U, Joe M, Sedaghat L et al (2004) Serotonin regulates osteoclast differentiation through its transporter. *J Bone Miner Res* 19:1420–1431
54. Modder UI, Roforth MM, Hoey K, McCready LK, Peterson JM, Monroe DG et al (2011) Effects of estrogen on osteoprogenitor cells and cytokines/bone-regulatory factors in postmenopausal women. *Bone* 49:202–207
55. Jonnakuty C, Gragnoli C (2008) What do we know about serotonin? *J Cell Physiol* 217:301–306
56. Hirowatari Y, Hara K, Kamihata H, Iwasaka T, Takahashi H (2004) High-performance liquid chromatographic method with column-switching and post-column reaction for determination of serotonin levels in platelet-poor plasma. *Clin Biochem* 37:191–197
57. Pussard E, Guigueno N, Adam O, Giudicelli JF (1996) Validation of HPLC-amperometric detection to measure serotonin in plasma, platelets, whole blood, and urine. *Clin Chem* 42:1086–1091

Supplemental Table 1. Anthropometric, disease, DXA and laboratory variables of the study sample.

Characteristic (n=205)	Mean (standard-deviation) or number of patients (%)
Patient related	
Female, n (%)	165 (80.5)
Postmenopausal, n (%)	98 (47.8)
Time since menopause, mean (SD), years	7.300 (8.379)
Male, n (%)	40 (20.0)
Age, mean (SD), years	53.580 (11.385)
BMI, mean (SD), kg/m ²	27.127 (4.796)
< 25	76 (37.1)
Ever smokers, n (%)	28 (13.7)
RA related, mean (SD)*	
Diagnosis age, mean (SD), years	40.060 (13.372)
Disease duration, mean (SD), years	13.53 (10.038)
RF positivity (>30 UI/L), n (%)	119 (58.049)
Anti-CCP antibodies positivity (>7 U/mL), n (%)	163 (79.512)
DAS28 (4V), mean (SD)	4.282 (1.360)
Disease activity – DAS28 (4V)	
Remission (DAS28(4v)<2.6)	19 (9.3)
Low (2.6<DAS28(4v)≤3.2)	30 (14.6)
Moderate (3.2<DAS28(4v)≤5.1)	103 (50.2)
High (DAS28(4v)>5.1)	53 (25.9)
TJC (out of 68), mean (SD)	11.800 (12.127)
SJC (out of 66), mean (SD)	4.922 (5.717)
ESR, mm (first hour), mean (SD)	26.660 (19.282)
CRP, mg/L, mean (SD)	11.200 (19.368)
Global health on VAS, mean (SD), mm	44.860 (18.244)
HAQ score, mean (SD)	1.250 (0.710)
HAQ≤0.5, n (%)	32 (15.6)
RA related treatment and others	
Corticosteroids, n (%)	165 (80.5)
Daily dose in prednisolone equivalents, mean (SD), mg	5.126 (3.900)
Time under corticosteroids, mean (SD), years	11.322 (8.988)
DMARDs, n (%)	171 (83.4)
Cumulative, mean (SD)	2.498 (1.388)
Time under DMARDs, mean (SD), months	98.917 (84.794)
Methotrexate, n (%)	139 (67.8)
Leflunomide, n (%)	45 (22.0)
Biologic DMARDs, n (%)	103 (50.2)
Monotherapy, n (%)	34 (16.6)
Time under biologics, mean (SD), months	31.937 (37.308)
Anti-TNFα blockers, n (%)	84 (40.9)
Non-anti-TNFα biologics, n (%)	19 (9.4)
Bisphosphonates, n (%)	68 (33.2)
Time under bisphosphonates, mean (±SD), months	17.776 (30.709)
Vitamin D supplements, n (%)	43 (21.0)
Folic acid supplements, n (%)	109 (53.2)
Proton bomb inhibitors, n (%)	145 (70.7)
SSRIs, n (%)	13 (6.3)
BBs, n (%)	18 (8.8)

DXA parameters, mean (SD)*	
Left total femoral BMD, g/cm ²	0.938 (0.151)
Lumbar spine BMD, g/cm ²	1.076 (0.175)
Left hand BMD, g/cm ²	0.386 (0.069)
Left second proximal phalange BMD, g/cm ²	0.374 (0.061)
WHO classification	
Normal, n (%)	80 (39.0)
Osteopenia, n (%)	64 (31.2)
Osteoporosis, n (%)	36 (17.6)
Serum biomarkers, mean (SD)*	
Calcium, mEq/L	4.708 (0.183)
Phosphorus, mg/L	31.889 (5.903)
Alkaline phosphatase, U/L	72.756 (24.027)
Creatinine, mg/L	8.784 (2.284)
25(OH) vitamin D3, ng/mL	25.739 (12.610)
<30, n (%)	133 (64.9)
β-CTX, ng/mL	0.291 (0.186)
Osteocalcin, ng/mL	16.899 (7.831)
Intact PTH, pg/mL	43.682 (21.637)
DKK-1, pmol/L	101.592 (59.155)
Sclerostin, ng/mL	0.244 (0.098)
OPG, pmol/L	3.857 (1.960)
RANKL, pmol/L	3753.305 (2071.543)
OPG/RANKL ratio	0.00153 (0.00184)
Serotonin, ng/mL	179.268 (108.497)

BBs, beta-blockers; β-CTX, β-isomerised carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen; BMD, bone mineral density; BMI, body mass index; CCP, cyclic citrullinated peptides; CRP, c-reactive protein; DAS, disease activity score; DKK-1, dickkopf-1; DMARDs, disease-modifying antirheumatic drugs; DXA, dual-energy X-ray absorptiometry; ESR, erythrocyte sedimentation rate; HAQ, health assessment questionnaire; OPG, osteoprotegerin; PTH, parathormone; RANKL, receptor activator of nuclear factor–kappa B ligand; RA, rheumatoid arthritis; RF, rheumatoid factor; SD, standard deviation; SJC, swollen joint count; SSRIs, specific serotonin reuptake inhibitors; TJC, tender joint count; TNFα, tumor necrosis factor alpha; VAS, visual analogic scale; WHO, World Health Organization; *unless otherwise indicated.

Supplemental Table 2. Pearson correlation coefficients between serum serotonin and DXA, clinical and laboratory parameters, in all the rheumatoid arthritis patients as well as separately in women and men.

	Whole sample	Women	Men
DXA parameters			
Total proximal left femur BMD (g/cm²)	r= -0.195; p= 0.010	r= -0.226; p= 0.008	r= -0.083; p= 0.642
Lumbar spine BMD (g/cm ²)	r= -0.004; p= 0.956	r= -0.008; p= 0.921	r= -0.136; p= 0.436
Left hand BMD (g/cm ²)	r= -0.065; p= 0.420	r= -0.112; p= 0.212	r= -0.118; p= 0.528
Left second proximal phalange BMD (g/cm ²)	r= -0.034; p= 0.678	r= -0.070; p= 0.450	r= 0.045; p= 0.814
Patient related			
Age	r= -0.101; p= 0.148	r= -0.103; p= 0.186	r= -0.104; p= 0.524
BMI (Kg/m²)	r= -0.220; p= 0.002	r= -0.218; p= 0.005	r= -0.279; p= 0.086
Disease related			
Disease duration	r= -0.055; p= 0.431	r= -0.008; p= 0.918	r= -0.340; p= 0.032
Months under biologicals	r= 0.041; p= 0.561	r= 0.104; p= 0.185	r= -0.255; p= 0.112
Years under corticosteroids	r= -0.045; p= 0.526	r= 0.007; p= 0.922	r= -0.326; p= 0.004
Prednisolone daily dose (mg)	r= -0.026; p= 0.711	r= -0.102; p= 0.193	r= 0.220; p= 0.173
Months under DMARDs	r= -0.035; p= 0.617	r= 0.009; p= 0.906	r= -0.288; p= 0.072
Months under anti-osteoporotic drugs	r= 0.090; p= 0.200	r= 0.117; p= 0.135	r= -0.100; p= 0.541
DAS28 (4V)	r= -0.014; p= 0.839	-	-
TJC (out of 68)	r= -0.069; p= 0.328	-	-
SJC (out of 66)	r= -0.033; p= 0.636	-	-
ESR, mm (first hour)	r= 0.104;	-	-

	p= 0.138		
CRP, mg/L	r= 0.023; p= 0.744	-	-
Global health on VAS, mm	r= -0.056; p= 0.423	-	-
HAQ score	r= -0.104; p= 0.140	-	-
Serum bone biomarkers			
Alkaline phosphatase, U/L	r= -0.049; p= 0.482	r= -0.027; p= 0.732	r= -0.162; p= 0.318
25(OH) vitamin D3, ng/mL	r= -0.055; p= 0.435	r= -0.099; p= 0.209	r= 0.080; p= 0.624
β-CTX, ng/mL	r= -0.069; p= 0.332	r= -0.149; p= 0.058	r= 0.334; p= 0.035
Osteocalcin, ng/mL	r= -0.113; p= 0.109	r= -0.160; p= 0.043	r= 0.122; p= 0.452
Intact PTH, pg/mL	r= -0.140; p= 0.047	r= -0.140; p= 0.077	r= -0.139; p= 0.394
DKK-1, pmol/L	r= -0.026; p= 0.710	r= -0.066; p= 0.400	r= 0.229; p= 0.155
Sclerostin, ng/mL	r= -0.044; p= 0.537	r= 0.025; p= 0.758	r= -0.374; p= 0.021
OPG, pmol/L	r= -0.072; p= 0.305	r= -0.082; p= 0.296	r= -0.019; p= 0.907
RANKL, pmol/L	r= -0.045; p= 0.528	r= -0.041; p= 0.602	r= -0.071; p= 0.664
OPG/RANKL ratio	r= -0.009; p= 0.898	r= -0.006; p= 0.938	r= -0.037; p= 0.822

β-CTX, β-isomerised carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen; BMD, bone mineral density; BMI, body mass index; CRP, c-reactive protein; DAS, disease activity score; DKK-1, dickkopf-1; DMARDs, disease-modifying antirheumatic drugs; DXA, Dual-energy X-ray absorptiometry; ESR, erythrocyte sedimentation rate; HAQ, health assessment questionnaire; OPG, osteoprotegerin; PTH, parathormone; RANKL, receptor activator of nuclear factor-κ B ligand; SJC, swollen joint count; TJC, tender joint count; VAS, visual analogic scale.

DISCUSSÃO

1. Artrite reumatoide e dano vascular

1.1. Aterosclerose e osteoporose

1.1.1. Frequências e associações epidemiológicas

A incidência de osteoporose e das doenças cardiovasculares tem vindo a aumentar devido ao envelhecimento da população. Durante bastante tempo, estas duas doenças foram consideradas independentes uma da outra, até que estudos epidemiológicos em finais da década de 90 do século passado produziram provas incontestáveis de uma associação entre ambas as entidades. Adicionalmente, o conhecimento científico acerca dos processos fisiopatológicos partilhados por ambas as doenças tem também sido aprofundado (304).

Seguidamente expõem-se algumas das evidências científicas da associação entre aterosclerose e osteoporose e que fundamentam alguns dos resultados obtidos nos dois primeiros trabalhos desta dissertação.

Estudos retrospectivos e transversais demonstraram uma associação entre a presença de alterações na parede vascular e uma DMO baixa. Num estudo transversal com 45 mulheres pós-menopáusicas assintomáticas, o SCC foi avaliado por TC e a DMO da coluna lombar por DXA (305). O SCC médio foi de 42 no grupo com DMO normal (*score* $t > -1$), 115 no grupo com osteopenia e 221 no grupo com osteoporose (*score* $t < -2,5$). Num outro estudo transversal, avaliaram-se as associações entre a cclMT, medida por ecografia com Doppler, e a DMO, determinada por DXA, em 535 mulheres e 335 homens (306). Nos subgrupos das mulheres e dos homens com mais de 60 anos, a DMO correlacionou-se negativamente com a cclMT. Por último, num estudo retrospectivo, envolvendo 209 doentes (89% mulheres) verificou-se que o risco de apresentar uma estenose $>50\%$ de uma artéria coronária por angiografia era maior no grupo de doentes com osteoporose [DMO *score* $t < -2,5$; odds ratio (OR): 5,6; $p < 0,0001$]. Além disso, a DMO associou-se mais fortemente à doença arterial coronária do que os fatores de risco cardiovascular convencionais (tabagismo, hipertensão, diabetes e história familiar) (307).

Por outro lado, outros estudos retrospectivos evidenciaram um risco excessivo de doença cardiovascular em doentes com osteoporose. Num estudo retrospectivo com 350 doentes, com e sem cardiopatia isquémica, e utilizando a TC quantitativa de alta resolução para medir a DMO volumétrica total, cortical e trabecular assim como a microarquitetura óssea no rádio distal e na tíbia distal, verificou-se que a DMO cortical no rádio distal foi significativamente menor ($p < 0,001$) e a porosidade cortical significativamente maior ($p < 0,05$) nos doentes com doença cardíaca isquémica. Quando os géneros foram analisados separadamente, nas mulheres, nenhuma das diferenças foi estatisticamente significativa (308) e, nos homens, apenas a DMO

volumétrica cortical do rádio distal foi significativamente inferior no grupo com doença cardíaca isquêmica ($p<0,001$).

Num outro estudo retrospectivo, em mulheres pós-menopáusicas ($n=1000$), a prevalência de doença cardiovascular foi de 69% no grupo com osteoporose ($score\ t\ da\ anca<-2,5$) e de apenas 22% no grupo com DMO normal ($p<0,001$) (309). Num estudo transversal, envolvendo 5050 homens e mulheres, encontrou-se uma associação significativa entre a história de enfarte do miocárdio e a DMO baixa, após ajuste para os fatores de risco (OR: 1,28; $p<0,05$) (310). Nas análises por subgrupos, em função do gênero, a associação manteve-se presente nos homens, mas não nas mulheres. Num outro estudo transversal, foram estudados 2235 doentes com idade igual ou superior a 65 anos, sendo submetidos a DXA e a testes para doença coronária (311). O diagnóstico de osteoporose ($score\ t\ da\ anca<-2,5$) correlacionou-se significativamente com a presença de doença arterial coronária (OR: 1,6; $p<0,05$). Por outro lado, estudos prospectivos também fornecem evidências epidemiológicas de uma associação entre aterosclerose e osteoporose. Assim, no estudo prospectivo da coorte MINOS, que incluiu 744 homens com idade superior a 50 anos (312), durante um período de seguimento de 7,5 anos, 40 doentes sofreram um enfarte do miocárdio e 43 um acidente vascular cerebral. Após ajuste para os fatores de risco, os homens com DMO no quartil mais baixo ou com marcadores de reabsorção óssea no quartil mais elevado apresentaram o dobro do risco de eventos cardiovasculares. Além disso, após o ajuste, a DMO foi significativamente menor nos pacientes com acidente vascular cerebral. Noutro estudo prospectivo, envolvendo uma coorte de 6872 homens e mulheres, avaliados durante 5,7 anos, 196 indivíduos sofreram um enfarte do miocárdio (313). A ocorrência de enfarte do miocárdio associou-se significativamente a menor DMO da anca (mulheres - HR: 1.33; IC 95%: 1,08-1,66; homens - HR: 1.74; IC 95%: 1.34 -2.28).

Relativamente à doença arterial periférica, salienta-se um estudo prospectivo de 1332 indivíduos saudáveis, em que se determinou a relação entre o índice tornozelo-braço e a DMO (314). A frequência de osteoporose ($score\ t\ da\ anca<-2,5$) foi significativamente maior nas mulheres com um índice tornozelo-braço baixo, ou seja, com critérios de doença arterial periférica ($p<0,05$). Esta associação não foi verificada nos homens. Noutro estudo, também envolvendo medições do índice tornozelo-braço e da DMO do rádio distal e da anca, em 5781 homens com idade igual ou superior a 65 anos (315), a presença de um índice tornozelo-braço baixo associou-se a um declínio significativamente maior da DMO na anca ($-0,66\%/ano\ versus\ -0,34\%/ano$, em participantes cujo índice tornozelo-braço era normal, $p=0,001$).

Na nossa amostra de doentes com artrite reumatoide, assintomáticos para doença cardiovascular e submetidos a avaliação do SCC por TC ($n=78$), 64% apresentaram valores de SCC normais ou quase normais (≤ 10). A presença de cálcio nas artérias coronárias foi detetada

em 41 (53%) doentes [$1 < \text{SCC} \leq 10$: 13 (17%); $10 < \text{SCC} \leq 100$: 17 (22%); $100 < \text{SCC} \leq 400$: 9 (11%); $\text{SCC} > 400$: 2 (3%)]. O valor médio de SCC foi de $46,133 \pm 122,892$, afetando mais frequentemente a artéria coronária descendente anterior.

Paralelamente, na nossa amostra de doentes com artrite reumatoide ($n=208$), por critérios densitométricos e segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 103 doentes eram osteopénicos ($n=70$, 33.7%) ou osteoporóticos ($n=33$, 15.9 %), 69 (33.2%) estavam medicados com bisfosfonatos e 43 (20.7%) com suplementos de vitamina D. Nenhuma das 99 mulheres pós-menopáusicas se encontrava sob moduladores seletivos de recetores de estrogênio ou sob terapia hormonal (preparações de estrogênio oral ou transdérmico com ou sem progestativo). À semelhança de estudos já acima referenciados, na nossa população de doentes com artrite reumatoide, assintomáticos para doença cardiovascular, a presença de um valor de $\text{SCC} > 10$ foi associada a vários parâmetros da DXA [DMO total do fémur proximal esquerdo ($\text{OR}=0,012$; $p=0,014$) e DMO da coluna lombar ($\text{OR}=0,009$; $p=0,006$)] assim como à presença de osteoporose ($\text{OR}=5,447$; $p=0,012$) (dados brutos da análise de regressão logística). Após ajuste para a idade e o sexo, mantiveram-se significativas as associações com a DMO total do fémur proximal esquerdo ($\text{OR}=0,012$; $p=0,037$) e a DMO da coluna lombar ($\text{OR}=0,022$; $p=0,046$). Contudo, quando procedemos a ajuste para a idade, sexo e IMC, estas associações perderam significância estatística.

1.1.2. Fatores de risco para doença aterosclerótica em doentes com artrite reumatoide

A osteoporose e a aterosclerose partilham uma série de fatores de risco genéticos e clínicos. Entre os fatores de risco clínicos comuns, salientam-se: a idade, a menopausa precoce, o sedentarismo, o tabagismo, a diabetes *mellitus*, a deficiência de vitamina D, a terapêutica com corticosteroides e a artrite reumatoide (304).

O stresse e a hipertensão arterial, por sua vez, são fatores de risco exclusivamente associados à doença cardiovascular e o défice de ingestão de cálcio e o etilismo estão mais associados à presença de osteoporose (304).

Existem ainda fatores de risco clínicos que têm efeitos opostos em ambas as patologias, como é o caso do sexo e da obesidade (304). Nas mulheres a privação estrogénica após a menopausa é a principal causa de osteoporose e também contribui para o aumento do risco cardiovascular na pós-menopausa até aos níveis de risco observados nos homens (304). Por outro lado, a obesidade, que é um fator de risco cardiovascular “clássico”, parece associar-se a menor risco de fraturas (304). Convém realçar, no entanto, que os estudos sobre o risco de fratura em indivíduos com excesso de peso produziram resultados contraditórios (304).

Na nossa amostra de doentes com artrite reumatoide, assintomáticos para doença cardiovascular, os dados brutos da análise de regressão logística, revelaram que a presença de um valor de SCC>10 associava-se à idade (OR=1,076; $p=0,004$), ao IMC ≥ 30 Kg/m² (OR=0,072; $p=0,017$), aos níveis séricos de homocisteína (OR=1,176; $p=0,038$), à presença de diabetes *mellitus* (OR=13,429; $p=0,019$) e uso de antidiabéticos (OR=13,364; $p=0,020$). Após ajuste para a idade e o sexo, todas estas associações perderam significância estatística exceto o IMC. Além disso, após ajuste para o IMC, a idade e o sexo, todas as associações anteriores perderam a significância estatística.

De facto, o peso corporal parece ter um efeito importante na modulação do risco cardiovascular em doentes com artrite reumatoide. O efeito aparentemente protetor do peso corporal relativamente à doença coronária, pode ser explicado pelo facto de, apesar de a obesidade ser frequente em doentes com artrite reumatoide, a presença de caquexia é que traduz habitualmente uma atividade de doença inflamatória mais elevada e desta forma, pode condicionar um aumento da mortalidade cardiovascular nestes doentes (100). Por seu turno a obesidade tem sido relacionada com uma diminuição da mortalidade cardiovascular na artrite reumatoide (59).

Na nossa população de doentes também verificámos que a presença de um valor de SCC>10 se associava a múltiplos parâmetros do metabolismo lipídico mas com significâncias estatísticas distintas [HDL (OR=0,016; $p=0,015$), razão LDL/HDL (OR=1,767; $p=0,045$), ApoA1 (OR=0,970; $p=0,009$), razão ApoB/ApoA1 (OR=28,657; $p=0,011$)] e à medicação com estatinas (OR=3,413; $p=0,03$). Após ajuste para a idade e o sexo, mantiveram-se significativas apenas as associações com as HDL, a ApoA1 e a razão ApoB/ApoA1.

Quando ajustámos para o IMC, a associação com as HDL perdeu significância estatística, permanecendo significativas as associações com o uso de estatinas, ApoA1 e a razão ApoB/ApoA1 (de longe a de maior magnitude). Este resultado vai de encontro ao obtido num estudo recente, em doentes com artrite reumatoide, em que a razão ApoB/ApoA1 foi o melhor preditor de progressão da doença cardiovascular (HR: 4,5) quando comparado com outros lipídeos ou com a VS e a PCR (HR: 1,1-2,2) (156).

1.1.3. Mecanismos fisiopatológicos envolvidos na interação osteoporose-aterosclerose em doentes com artrite reumatoide

1.1.3.1. Interleucinas pro-inflamatórias e pró-reabsortivas

Em termos fisiopatológicos, verifica-se um aumento da libertação de citocinas pró-inflamatórias e pró-reabsortivas tanto na calcificação vascular quanto na osteoporose. Níveis séricos mais elevados de PCR e das citocinas pró-inflamatórias IL6 e TNF α estão associados a

uma maior gravidade da aterosclerose (316). A IL6 e o TNF α podem ser produzidos na parede do vaso pelas células endoteliais, células do músculo liso e macrófagos. Estas citocinas desencadeiam o recrutamento de macrófagos e monócitos, que podem então diferenciar-se em células osteogénicas capazes de formar calcificações (317).

Por outro lado, os níveis de IL6 e TNF α são potentes estimuladores da osteoclastógenese e, consequentemente, da reabsorção óssea (318).

Assim, os efeitos de citocinas, tais como a IL6 e o TNF α (que aumentam em mulheres pós-menopáusicas), podem explicar o facto de a artrite reumatoide ser simultaneamente um fator de risco para a osteoporose e para as doenças cardiovasculares.

Corroborando a hipótese dos fatores inflamatórios serem intervenientes importantes no desenvolvimento de aterosclerose na artrite reumatoide, na nossa amostra de doentes a presença de um valor de SCC>10 associou-se a parâmetros de atividade inflamatória da doença reumatoide [PCR (OR=1,046; $p=0,022$), DAS(4v) (OR=1,584; $p=0,019$), DAS(4v; CRP) (OR=1,558; $p=0,022$)] e de dano articular pela doença [índice de erosão SHS (score de Sharp modificado por van der Heijde - OR=1,012; $p=0,018$)]. Após o ajuste para o sexo e a idade, também emergiu uma associação significativa com o SHS total (OR=1,007; $p=0,044$). As associações com a PCR, o DAS(4v) e o DAS(4v; PCR) mantiveram-se significativas, quer quando procedemos ao ajuste para a idade e para o sexo, quer quando ajustámos para a idade, o sexo e o IMC. As associações com o dano estrutural radiográfico perderam a sua significância estatística quando ajustámos para os últimos 3 confundidores.

1.1.3.2. Vias de metabolismo ósseo

Outros dos mecanismos propostos para a associação entre aterosclerose e osteoporose na artrite reumatoide são as anomalias nas vias convencionais de estimulação das células ósseas.

Entre as células recrutadas para as placas de ateroma, temos as células vasculares calcificantes semelhantes a osteoblastos, que têm um fenótipo muito semelhante ao dos osteoblastos do tecido ósseo. Além disso, algumas proteínas, que se pensava serem específicas apenas do tecido ósseo, foram identificadas dentro das placas de ateroma, nomeadamente a BMP2, a osteopontina, o *gamma-carboxyglutamic domain* (GLA) e a OPG (319). As células vasculares calcificantes são provavelmente reguladas pelos mesmos fatores que os osteoblastos, incluindo a via RANK-RANKL-OPG (320). Estudos em animais e ensaios em seres humanos demonstraram a intervenção destes fatores tanto na osteoporose como nas calcificações vasculares (304).

A OPG é um inibidor natural da via do RANK-RANKL e, portanto, inibe fortemente a reabsorção óssea. Em ratinhos deficientes em OPG, foi verificado o aparecimento simultâneo de calcificações vasculares e fraturas de fragilidade (321). A OPG parece atuar como um regulador

autócrino e parácrino da calcificação vascular, parecendo ser um promissor marcador de doença vascular (304). No processo de remodelagem vascular que caracteriza a aterosclerose, a OPG parece estar aumentada devido à ativação dum mecanismo compensatório secundário (322). Neste contexto, a elevação dos níveis séricos de OPG têm sido associados à aterosclerose coronária (323), à isquemia miocárdica silenciosa, ao aumento da mortalidade por doença cardiovascular (324), ao enfarte do miocárdio e ao prognóstico da insuficiência cardíaca (325). Também em doentes em hemodiálise, os níveis de OPG foram associados ao SCC (326). Em doentes com enfarte agudo do miocárdio, os níveis séricos de OPG foram, inclusivamente, preditores da mortalidade subsequente (327).

Pelo contrário, o RANKL promove a calcificação na parede vascular e tem sido associado, principalmente, ao risco de instabilidade e rotura da placa de ateroma (328).

O DKK-1 está ligado não apenas aos efeitos do TNF α nas articulações dos doentes com artrite reumatoide (329), mas também com a ativação das células endoteliais mediada pelas plaquetas (330), a disfunção endotelial na diabetes *mellitus* tipo 2 (331), a calcificação vascular (332) e à ocorrência de enfarte do miocárdio prematuro (idade \leq 40 anos) (333). Até agora, poucos estudos permitiram tirar conclusões definitivas sobre o papel dos níveis séricos do DKK-1 na avaliação do risco cardiovascular. O DKK-1 correlacionou-se com o SCC numa população de doença não-inflamatória (334), no entanto, noutro estudo em doentes com estenose valvular aórtica calcificada sintomática, a presença de aterosclerose coronária concomitante relacionou-se com níveis séricos de DKK-1 significativamente menores (335).

Na nossa população de doentes com artrite reumatoide, assintomáticos para doença cardiovascular, a análise de regressão logística mostrou que a presença de um valor de SCC > 10 se associava a dois dos novos biomarcadores da aterosclerose e do metabolismo ósseo [o DKK-1 (OR=1,014; $p=0,017$) e a OPG (OR=1,381; $p=0,031$)]. Contudo, após ajuste para a idade e o sexo, só a associação com o DKK-1, um inibidor natural da via Wnt/ β -catenina canónica, é que se manteve estatisticamente significativa; não perdendo, inclusivamente, significância com o ulterior ajuste para o IMC.

Nos doentes avaliados por cintigrafia de perfusão miocárdica, não encontramos associações entre os defeitos de perfusão miocárdica e os níveis séricos isolados de RANKL ou OPG, mas sim com o 4º quartil da distribuição da razão OPG/RANKL (OR=2,88; IC 95%: 1,091-7,622). Uma possível interpretação para esta associação é a de que o valor elevado desta razão pode ser devido à presença continuada de um processo aterosclerótico vascular em curso (OPG elevada), em placas de ateroma ainda estáveis e de baixo risco (RANKL baixo). Por outro lado, também encontrámos uma associação significativa entre níveis séricos de DKK-1 \geq 133 pmol/L e a presença de defeitos de perfusão miocárdica (OR=2,69; IC 95%: 1,058-6,840).

Estudos mais recentes, focaram-se na esclerostina, um outro inibidor natural da via Wnt/ β -catenina canónica. Em doentes em hemodiálise, a esclerostina parece ser um marcador de mortalidade cardiovascular (336). Também em indivíduos com função renal normal, os níveis de esclerostina correlacionaram-se negativamente com os valores da DMO em ambos os sexos.

Outros mediadores envolvidos no metabolismo ósseo e potenciais moduladores de doença vascular são a PTH e o *fibroblast growth factor* (FGF-23) (304). A PTH está envolvida na osteoporose relacionada com a idade, uma vez que o declínio da função renal e a elevada prevalência de deficiência de vitamina D em doentes idosos contribuem para o desenvolvimento de hiperparatireoidismo secundário. A proteína relacionada com a PTH e/ou a PTH são conhecidas por exercerem também efeitos vasculares (337, 338). Um estudo em doentes com hiperparatireoidismo primário mostrou uma prevalência elevada de hipertensão arterial e um aumento da morbilidade e da mortalidade cardiovasculares (339).

Além disso, o FGF-23 e o klotho também têm papéis ativos nestes processos. O FGF-23 foi identificado pela primeira vez em doentes com osteomalacia hipofosfatémica associada a neoplasias, por perda renal de fósforo. O FGF-23 contribui para regular o metabolismo do fósforo, aumentando a excreção tubular de fósforo e inibindo a hidroxilação de 25(OH) vitamina D3 a 1,25(OH)₂ vitamina D3 (calcitriol) (340). O klotho, um dos co-receptores do FGF-23, é uma proteína que foi identificada pela primeira vez no rim, mas está presente em muitos outros tecidos. O calcitriol estimula a produção de klotho, que é expressa na parede arterial (341). Em modelos animais, a deficiência de klotho induz a transformação das células endoteliais em células semelhantes a osteoblastos, que iniciam a mineralização. Pelo contrário, o aumento da expressão do klotho, devida à ativação do recetor de calcitriol, inibe a calcificação vascular. A insuficiência renal está associada a uma diminuição da expressão de klotho (342). Em doentes em hemodiálise, a hiperfosfatemia aumenta os níveis séricos de FGF-23, inicialmente, para diminuir os níveis séricos de fósforo (342). Tanto nos animais como em seres humanos, o fósforo tem efeitos tóxicos diretos na parede dos vasos. A combinação de FGF-23 elevado, hiperfosfatemia e klotho baixo está associada a um aumento da mortalidade cardiovascular (342). Contudo, ainda não é claro se o risco cardiovascular em doentes com insuficiência renal está diretamente relacionado com os efeitos do fósforo ou é um reflexo da falência do sistema FGF-23/klotho. Também não se sabe se o FGF-23 tem efeitos tóxicos diretos nos vasos e se a expressão de klotho é um fator de risco para calcificações vasculares ou apenas um marcador de insuficiência renal e deficiência de calcitriol (342).

Em doentes com função renal normal, foi recentemente confirmada a associação entre os níveis séricos de FGF-23 e a mortalidade cardiovascular. Num estudo alemão, em 2974 indivíduos com idade média(DP) de 63(10) anos, os níveis basais de FGF-23 correlacionaram-se com a

mortalidade cardiovascular, durante um período de 10 anos de seguimento. Os níveis basais de FGF-23 no quartil superior foram associados a um risco de mortalidade cardiovascular de 2,56 ($p=0,001$). Após ajuste para fatores de risco cardiovascular convencionais e vários parâmetros biológicos (cálcio, PTH, fosfatase alcalina, vitamina D e fósforo), essa associação permaneceu significativa (HR: 1,35) (343). Paralelamente, num estudo sueco, que avaliou 973 indivíduos com idade média de 70 anos (50% mulheres), os níveis séricos mais elevados de FGF-23 foram associados à ocorrência de eventos cardiovasculares *major* durante 5 anos de seguimento (OR de 1,92 para os 2º e 3º tercils *versus* o 1º tercil). Esta associação manteve-se significativa após ajuste para os fatores de risco (OR: 1,69) (344). Num outro estudo alemão, os achados foram semelhantes. Os 1978 participantes tiveram um total de 359 acidentes vasculares cerebrais e 463 enfartes do miocárdio. Neste estudo, níveis de FGF-23 no quartil superior foram associados a um aumento de 36% no risco de eventos cardiovasculares durante um seguimento médio de 8,2 anos (345). Da mesma forma, numa coorte francesa de voluntários do sexo masculino, níveis de FGF-23 no quartil superior foram associados a doença cardíaca isquémica e a calcificações da aorta abdominal (346).

Adicionalmente, os níveis de FGF-23 podem também estar associados à osteoporose. Um estudo sueco de 2011 demonstrou uma associação entre os níveis séricos de FGF-23 e o risco de fratura em 2868 homens com idades médias (DP) de 75,4(3,2) anos (347). Nos homens cujo nível de FGF-23 era $>55,7$ pg/mL, o risco de fraturas não-vertebrais aumentava 2,30 vezes (IC 95%: 1,16-4,58) (348). Pelo contrário, numa coorte de 5994 homens idosos nos EUA, os níveis de FGF-23 não foram significativamente associados ao risco de fratura na população geral, nem no subgrupo com doença renal crónica (349). Contudo, os indivíduos cuja taxa de filtração glomerular era <60 mL/min e cujo nível de FGF-23 estava no quartil superior apresentaram um risco relativo de fratura de 2,02 (IC 95%: 1,07-3,79).

1.1.3.3. Stresse oxidativo e LDL oxidadas

Na aterosclerose, os lípideos acumulam-se nas paredes dos vasos sob a influência de numerosos processos bioquímicos, inflamatórios e auto-imunes e em mais de 90% das placas ateroscleróticas carregadas de lipídeos ocorre calcificação (350). Por outro lado, numerosos estudos demonstraram uma associação direta entre a extensão da calcificação da placa e a mortalidade cardiovascular (351).

Em termos de perfil lipídico, sabe-se que na artrite reumatoide ocorre um aumento dos níveis de LDL oxidadas no sangue periférico, assim como de anticorpos anti-LDL oxidadas (120).

O stresse oxidativo na artrite reumatoide (que aumenta com a idade) promove a produção de lipídeos oxidados que, por sua vez, estimulam a diferenciação dos osteoblastos nas placas de ateroma (352). Curiosamente, inibem a diferenciação dos osteoblastos e induzem a diferenciação dos osteoclastos no tecido ósseo. Além disso, uma deficiente autofagia por parte dos osteoblastos resulta numa diminuição da mineralização óssea e num aumento do stresse oxidativo, potenciando o processo (353).

Na nossa população, a forte associação encontrada entre a razão ApoB/ApoA1 e a calcificação coronária corrobora a relação entre esta razão e o risco cardiovascular. A exploração das características das subfrações lipídicas, nomeadamente das LDL oxidadas, em doentes com artrite reumatoide poderá permitir aprofundar o conhecimento dos mecanismos envolvidos na aterogénese/calcificação coronária.

1.1.3.4. Isquemia intra-óssea

Por último, não deve ser esquecido o efeito potencial da isquemia intra-óssea no desenvolvimento de osteoporose. A remodelagem óssea está diretamente ligada ao suprimento sanguíneo intra-ósseo (354-356). Tal como acontece com todos os órgãos, o fluxo sanguíneo no osso parece estar intimamente relacionado com a atividade metabólica do tecido e o consumo de oxigénio é acoplado à formação óssea dependente dos osteoblastos. Por outro lado, os osteoblastos podem derivar do endotélio vascular. A troca de informação cruzada entre as células ósseas e as células endoteliais vasculares é assegurada através de moléculas de sinalização como o *vascular endothelial growth factor* (VEGF), a endotelina e o óxido nítrico. O sistema nervoso beta-adrenérgico regula o tónus vascular, a vasomotricidade e a formação óssea. A angiogénese óssea está intimamente associada à formação óssea, quer durante o crescimento, quer na reparação da fratura (304).

Em ratos, a sobrecarga mecânica do esqueleto está associada a um aumento da angiogénese, provavelmente mediado pelo VEGF, e a um aumento da formação óssea. Pelo contrário, em estudos com animais ooforectomizados, esta mesma sobrecarga mecânica traduz-se num aumento da remodelagem óssea e numa diminuição da vascularização (304). No Homem, estudos *in vivo* recentes, envolvendo RM nuclear/angiografia por RM demonstraram uma associação entre a DMO e o fluxo sanguíneo vertebral (355, 356). Além disso, num estudo histológico, foi verificado que a aterosclerose pode atingir as arteríolas intra-ósseas e que, nessa localização, as lesões ateroscleróticas eram mais comuns e mais severas em doentes submetidos a cirurgia por fratura da anca em comparação com doentes em seguimento, submetidos a artroplastia total da anca eletiva por osteoartrose (357). Da mesma forma, foi também demonstrado que em doentes com doença arterial unilateral dos membros inferiores, a perna

afetada possui valores significativamente inferiores de DMO em comparação com a perna contralateral (358). Este último estudo demonstra o efeito deletério direto da isquemia na DMO. Da mesma forma, já em 1962, um estudo em cadáveres tinha mostrado a presença de osteoporose cortical em indivíduos com doença arterial periférica (304).

1.2. Avaliação do risco de doença cardiovascular na artrite reumatoide

Na artrite reumatoide, os riscos relativos combinados para enfarte do miocárdio e insuficiência cardíaca congestiva são de 1,68 e 1,87, respetivamente (359). A isquemia miocárdica é frequentemente assintomática e a deteção clínica é frequentemente efetuada num estadio avançado da doença. A insuficiência cardíaca é uma das principais causas de morbilidade e mortalidade na artrite reumatoide, representando cerca de 20% da mortalidade nestes doentes (360). O risco de insuficiência cardíaca tem sido associado à positividade para o FR, à VS, ao envolvimento extra-articular grave e ao uso de corticosteroides (361).

Face ao risco aumentado de doença cardiovascular em doentes com artrite reumatoide, a EULAR estabeleceu recomendações específicas para a sua avaliação (90), preconizando a determinação de um *score* sistemático e padronizado de avaliação de risco coronário, o EuroSCORE. No entanto, este só inclui a avaliação de fatores de risco cardiovascular tradicionais e não está validado para a população reumatoide. Além disso, a EULAR recomenda ainda, como já referido na Introdução, o chamado SCORE modificado (85). Esta equação de risco permite estratificar os doentes em grupos de baixo, intermédio, alto e muito alto risco. Todos os grupos de risco devem ser aconselhados a corrigir os fatores associados ao estilo de vida. O uso de fármacos cardiovasculares, nomeadamente anti-hipertensores e agentes anti-dislipidémicos, deve ser considerado nos grupos de risco alto ou muito alto (>5% de risco anual de evento de doença cardiovascular segundo o SCORE modificado proposto pela EULAR), pois essas intervenções farmacológicas mostraram reduzir as taxas de eventos de doença cardiovascular nestes grupos. Os doentes com doença cardiovascular estabelecida, diabetes *mellitus* e doença renal crónica consideram-se incluídos nestes dois grupos de maior risco, não sendo necessário aplicar-lhes o SCORE modificado (362).

Contudo, cerca de um terço dos eventos cardiovasculares não são atribuíveis a fatores de risco "clássicos" de doença cardiovascular (363). Embora os scores de risco sejam úteis para determinar o risco entre diferentes populações, eles muitas vezes subestimam o risco individual. Isto é particularmente evidente naqueles doentes com risco intermédio (ou seja, entre 1 e 4% de risco anual de evento de doença cardiovascular segundo o SCORE modificado proposto pela EULAR) (362).

Por outro lado, existem inúmeras evidências de que o SCORE modificado não reflete de forma confiável o real risco de doença cardiovascular na artrite reumatoide. Assim, por exemplo, um estudo mostrou que, para doentes com artrite reumatoide com placas nas artérias carótidas, o FRS médio era tão baixo quanto 7% (grupo de baixo risco), quando de facto esta prevalência de aterosclerose carotídea está associada a uma taxa de incidência de evento de doença cardiovascular $\geq 39\%$ aos 10 anos (364). Além disso, na artrite reumatoide, as associações dos fatores de risco tradicionais com as taxas de eventos de doença cardiovascular estão enfraquecidas. Tal como referido na Introdução, a relação entre os lipídeos e a doença cardiovascular é mais inconsistente (365) e, pode chegar a ser, paradoxalmente, inversa (106). Por outro lado, o tratamento com metotrexato reduz em cerca de 20% o risco de eventos de doença cardiovascular na artrite reumatoide (117). De facto, a inflamação sistémica, presente nos doentes com artrite reumatoide, contribui substancialmente para o aumento do risco de doença cardiovascular, tanto pelo seu impacto adverso nos fatores de risco tradicionais, quanto nos efeitos diretos sobre os vasos (3), como já previamente discutido. Por isso, o manejo efetivo do risco de doença cardiovascular compreende não só o tratamento adequado dos fatores de risco convencionais, mas também o controle rigoroso da atividade inflamatória da doença reumatoide. No que diz respeito à aplicação do SCORE modificado (com o fator multiplicador de 1,5), recomendado pela EULAR, vários trabalhos revelaram que o risco cardiovascular aumentado não se restringe aos doentes com uma duração de doença >10 anos, nem aos em que o FR e/ou ACPAs são positivos ou ao pequeno subgrupo com manifestações extra-articulares (366). Ao se comparar as capacidades do SCORE modificado, do SCC e da ecografia carotídea em classificar os doentes com aterosclerose avançada (mas ainda sem estratificação de risco de doença cardiovascular) como sendo de risco alto ou muito alto obteve-se 19,4% de sensibilidade para o SCORE modificado >5 , 23,6% para o SCC >100 e 97,2% para a ecografia carotídea (148). Além disso, neste estudo, nos 41,2% de doentes sem calcificação das artérias coronárias foram detetadas placas carotídeas em 57,5% (148). Neste estudo, ao considerarem os achados da ecografia carotídea, adicionalmente às recomendações EULAR (SCORE modificado apenas), a proporção de doentes que passaram a ser estratificados como sendo de alto ou muito alto risco de doença cardiovascular aumentou de 22,1% para 77,9%, ou seja, aumentou 3,5 vezes (148). Na realidade, estes doentes passaram a ter indicação para receber um tratamento preventivo do risco de doença cardiovascular (148). Assim, se uma percentagem significativa dos doentes com artrite reumatoide considerados de baixo risco para doença cardiovascular pelo SCORE modificado estiverem realmente num risco muito mais alto, parece razoável realizar uma ecografia carotídea não só naqueles com risco intermédio mas também nos com baixo risco de acordo com o SCORE modificado (362). Por outro lado, a ausência de

placas ateroscleróticas nas artérias carótidas, identificáveis por ecografia, não exclui completamente a possibilidade da presença de doença arterial coronária significativa (367); num estudo, esta proporção foi de 13%. Além disso, este estudo acima referido (148) apresenta ainda algumas outras limitações, nomeadamente o seu desenho transversal, impedindo inferências em termos de causalidade (147). Assim, são necessários estudos longitudinais para determinar definitivamente o papel da ecografia carotídea na avaliação e manejo do risco de doença cardiovascular, assim como na redução das taxas de eventos cardiovasculares, nos doentes reumatoides (362). Da mesma forma, a sua aparente superioridade em relação ao SCC tem forçosamente que ser avaliada de uma forma longitudinal. Além disso, uma vez que a duração média de doença, neste estudo, foi de 10,8 anos, continua por esclarecer se a ecografia carotídea é tão útil nos doentes com doença precoce como naqueles com doença de longa evolução, nomeadamente em termos de melhoria da estratificação do risco de doença cardiovascular (362).

Na artrite reumatoide e para além de outros fatores de risco, tanto a aterosclerose das artérias carótidas como o SCC predizem o aparecimento de eventos de doença cardiovascular (368-370). As placas ateroscleróticas vulneráveis são aquelas mais ecolucentes, que normalmente possuem um núcleo rico em lipídeos, macrófagos e um baixo teor de colagénio (371). Pelo contrário, as placas menos vulneráveis à rotura são mais ecogénicas e contêm mais colagénio, mais tecido fibroso denso e quantidades variáveis de calcificação, representando uma doença mais avançada (371). Nos doentes com artrite reumatoide verifica-se um aumento da proporção de placas vulneráveis em consequência da atividade da doença (152). Assim, é altamente improvável que esta dependência da presença de placas carotídeas se traduza numa sobrestimação do risco de doença cardiovascular na artrite reumatoide. Por outro lado, também é verdade que o SCC é menos sensível neste contexto e este facto não é exclusivo da artrite reumatoide (372). Além disso, a ecografia carotídea, comparativamente ao SCC, é barata, não requer radiação e tem maior rentabilidade (362).

Recentemente, e no sentido de melhorar a estimativa individual do risco, as sociedades europeia e americana de Cardiologia recomendam duas estratégias complementares: a) o uso de biomarcadores, particularmente a PCR de alta sensibilidade; b) técnicas de imagiologia cardiovascular, incluindo-se aqui o SCC e a ecografia das carótidas (373, 374). Na presença de placas carotídeas o risco cardiovascular é considerado muito elevado (374), passando o doente a dispensar a determinação do SCORE modificado (90). Considerando que os doentes com artrite reumatoide apresentam duas a três vezes mais aterosclerose carotídea (assintomática) quando comparados com pessoas sem artrite reumatoide (152, 375-377), a avaliação regular de doença

carotídea nestes doentes poderá vir a ter um impacto significativo na classificação do risco e, portanto, no seu tratamento adequado (90).

1.2.1. Papel da imagiologia cardiovascular

Na nossa população de doentes com artrite reumatoide estabelecida e assintomáticos para doença cardiovascular, encontrámos uma prevalência elevada de defeitos de perfusão miocárdica (25%) e de calcificação coronária (36%), o que coloca em perspetiva a utilidade destas técnicas de imagem não-invasivas na estratificação do risco cardiovascular nestes doentes. Elas poderão ter interesse, particularmente, naqueles doentes com risco intermédio pelo SCORE modificado.

A técnica de imagem ideal para a avaliação do risco de doença cardiovascular em doentes com artrite reumatoide não está ainda estabelecida, mas sabe-se que deverá ser capaz de alcançar os seguintes objetivos: prever a mortalidade cardiovascular; permitir a deteção precoce da aterosclerose subclínica; ser suficientemente sensível à mudança num determinado intervalo de tempo, permitindo uma avaliação longitudinal da doença cardiovascular e o ajustamento individualizado e contínuo dos tratamentos específicos quer da artrite reumatoide quer da doença cardiovascular; detetar um maior número de manifestações de doença cardiovascular, para além da aterosclerose (378).

Atualmente, e conforme descrito anteriormente, a **ecografia carotídea** fornece as estimativas mais robustas e melhor validadas em termos de desenvolvimento futuro de doença cardiovascular em doentes com artrite reumatoide. No entanto, ela não representa de maneira alguma a técnica "ideal" conforme definida previamente. A presença de placa aterosclerótica (particularmente quando bilateral) na artéria carótida parece ser um preditor de futuras síndromes coronárias agudas, embora não esteja claro se é um tão forte preditor de outros eventos cardiovasculares. Por outro lado, a ecografia carotídea não avalia a função ventricular, nem a função valvular, que são complicações comuns e clinicamente significativas nos doentes com artrite reumatoide. Enquanto que a presença de placas nas carótidas se associa bastante à doença arterial coronária, a cclMT representa principalmente uma hipertrofia da média arterial, mediada pela hipertensão arterial, relacionando-se mais fortemente à hipertrofia ventricular esquerda (371).

Por outro lado, embora a cclMT esteja validada especificamente em coortes de doentes com artrite reumatoide, ela, na realidade, fornece apenas uma única medição não dinâmica, uma vez que as medições em série não foram úteis para o cálculo do risco cardiovascular ao longo do tempo e para o mesmo doente (estudo longitudinal) (379) e os resultados de outros estudos prospetivos de pequena escala são contraditórios (378).

Também o valor prognóstico **do índice tornozelo-braço na artrite** reumatoide ainda não foi avaliado em estudos longitudinais (378).

A TC é uma técnica não-invasiva e pode ser utilizada para determinar o **SCC** ou para efetuar uma **Angio-TC**. O SCC é um teste simples, que permite estimar o grau de calcificação dentro das artérias coronárias, tendo uma excelente correlação com a carga total de cálcio coronário em amostras histológicas (380) e, como já referimos, é uma medida direta da aterosclerose (precoce) (380). Um score de 0 está associado a baixo risco cardiovascular, enquanto as pontuações superiores a 1 estão associadas a um aumento desse mesmo risco (381). O *American College of Cardiology* (ACC) recomenda o uso do SCC para estratificação do risco quando o nível de risco de doença cardiovascular de um determinado indivíduo não é claro pelo uso dos algoritmos de risco de doença cardiovascular clínicos e tradicionais (382). A ESC faz uma recomendação semelhante (383). A angio-TC permite a visualização anatômica direta das artérias coronárias com o objetivo de detetar a presença de doença aterosclerótica. A sua capacidade de visualizar as artérias coronárias, que apresentam habitualmente diâmetros de 3 a 4 mm, decorre da sua alta resolução espacial (384). A Angio-TC é utilizada principalmente para avaliar doentes com uma probabilidade pré-teste baixa a intermediária de terem doença coronária significativa (385), e pode ser usada, potencialmente, na avaliação do risco cardiovascular em doentes com artrite reumatoide. Com a metodologia atual, a exposição a radiação numa Angio-TC está na região dos 3-4 mSv ou abaixo. A dose de radiação típica associada ao SCC é inferior a 1 mSv, tornando-a uma opção muito viável para a avaliação do risco cardiovascular (378).

Na nossa amostra de doentes com artrite reumatoide, assintomáticos para doença cardiovascular e submetidos a avaliação do SCC por TC (n=78), só 64% dos doentes é que apresentaram valores de SCC normais ou quase normais ($SCC \leq 10$) e a presença de cálcio nas artérias coronárias ($SCC > 1$) foi detetada em 41 (53%) doentes. O valor médio de SCC foi de $46,133 \pm 122,892$, afetando mais frequentemente a artéria coronária descendente anterior. Estes achados, mais uma vez, ilustram a importância que esta técnica pode ter na estratificação de risco nesta população de doentes.

A **cintigrafia de perfusão miocárdica** é um outro método de estratificação de risco cardiovascular validado em diferentes populações. Uma cintigrafia de perfusão miocárdica normal está associada a $\leq 1\%$ /ano de mortalidade cardiovascular combinada e de taxa de enfarte não-fatal (361). É um teste funcional não-invasivo que depende não apenas da presença de estenose coronária epicárdica (doença macrovascular), mas também da função endotelial, inclusive nos territórios dos pequenos vasos (doença microvascular), que pode ser afetada

precocemente durante o desenvolvimento da doença e pode ser modulada pelo estado inflamatório (361).

Na nossa amostra total de doentes com artrite reumatoide (n=208), 189 realizaram cintigrafia de perfusão miocárdica, que revelou a presença de defeitos de perfusão miocárdica ($SSS \geq 4$) em 47 (25%) doentes [defeitos ligeiros em 35 (18,5%), moderados em 10 (5,3%) e graves em 2 (1%)]. Os defeitos apresentaram uma SDS média de $4,1 \pm 3$ e uma extensão no stresse de $2,5 \pm 3,6\%$ e foram reversíveis no repouso em 31 casos (16%). A fração de ejeção do ventrículo esquerdo foi inferior a 45% em 9 (4,76%) doentes, apresentando-se com um valor médio de $63,7 \pm 9,8\%$. Os defeitos de perfusão foram únicos (25/47, 53%) ou múltiplos (22/47, 47%), não apresentando uma distribuição preferencial nos diferentes territórios coronários. Na análise de regressão logística, não foram encontradas quaisquer relações entre a presença de defeitos de perfusão miocárdica e a idade do doente, o sexo, as variáveis associadas à doença reumatoide ou à sua terapêutica, os hábitos tabágicos, a presença de dislipidemia, diabetes *mellitus* ou hipertensão arterial, nem com as determinações, aquando da inclusão no protocolo, dos níveis séricos de lipídeos, glicose ou insulina.

Os defeitos de perfusão miocárdica associaram-se sim ao IMC (OR=1,120; $p=0,002$), à terapêutica com antagonistas do recetor da angiotensina II (ARAs) (OR=2,471; $p=0,046$), uso de diuréticos (OR=2.195; $p=0,045$) e antidiabéticos orais (OR=3,031; $p=0,033$), bem como aos níveis circulantes de $BNP \geq 100$ pg/mL (OR=5,680; $p=0,001$). Numa análise de subgrupo, incluindo apenas os com $PCR > 3$ mg/L, encontrámos basicamente as mesmas associações e com magnitudes semelhantes, com as exceções das associações com os ARAs e o uso de diuréticos que perderam a significância estatística neste subgrupo.

A ausência de associação dos defeitos de perfusão na cintigrafia miocárdica à maioria dos fatores de risco cardiovascular tradicionais, incluindo perfil lipídico, e às variáveis da inflamação e da doença pode ser explicada pelo facto destas relações poderem ser modificadas pelo impacto do complexo e diverso arsenal terapêutico utilizado nestes doentes (imunossuppressores, anti-inflamatórios e fármacos cardioprotectores). Também é importante salientar que a natureza dos defeitos de perfusão em doentes com artrite reumatoide pode ter uma etiologia isquémica/aterosclerótica, mas também pode resultar de outras causas como amiloidose cardíaca ou fibrose intersticial (386). O impacto clínico da discriminação das diferentes causas dos defeitos de perfusão, por exemplo, por ressonância magnética cardíaca, ainda é desconhecido. A ausência duma avaliação por ressonância magnética cardíaca constitui, obviamente, uma limitação do nosso trabalho.

A proposta de utilização de qualquer método de avaliação de risco requer a demonstração do seu impacto na estratificação de risco em estudos longitudinais.

No nosso trabalho, os doentes que realizaram a cintigrafia de perfusão miocárdica foram seguidos durante um período de 5 anos, e dos 189 doentes previamente assintomáticos para doença cardiovascular, 9 faleceram, 2 de causas cardiovasculares: duas mortes súbitas, uma delas no contexto de enfarte agudo do miocárdio (confirmado por autópsia). Nestes dois doentes do sexo masculino, a fração de ejeção do ventrículo esquerdo era inferior a 45% e ambos apresentaram defeitos de perfusão na cintigrafia miocárdica na avaliação basal. Além das mortes por causas cardiovasculares, outros 3 doentes desenvolveram eventos de natureza cardiovascular. Um doente do sexo masculino, com bloqueio de ramo esquerdo no eletrocardiograma basal, mas sem defeitos de perfusão e com fração de ejeção do ventrículo esquerdo normal, teve um enfarte do miocárdio quatro anos após a cintigrafia de perfusão miocárdica. Uma doente do sexo feminino, com um defeito de perfusão ligeiro e fração de ejeção do ventrículo esquerdo normal na avaliação basal, desenvolveu angina e foi submetida à implantação dum *stent* percutâneo na artéria coronária descendente anterior. Outra doente, sem defeitos de perfusão e com fração de ejeção do ventrículo esquerdo normal, sofreu um acidente vascular cerebral aos quatro anos após a avaliação por cintigrafia de perfusão miocárdica. Todos estes 5 doentes que desenvolveram eventos cardiovasculares eram seropositivos para o FR e os ACPAs, não eram obesos, mas apresentavam pelo menos um fator de risco cardiovascular tradicional sob terapêutica, tinham uma atividade de doença [avaliada pelo DAS28(4v)] baixa a moderada e um valor de BNP normal na avaliação basal. Infelizmente, dada a dimensão da amostra e o reduzido número de eventos cardiovasculares no seguimento, não foi possível determinar o valor preditivo a 5 anos dos defeitos de perfusão na cintigrafia miocárdica. Da mesma maneira, este tipo de análise não foi possível de ser realizada na nossa amostra, ainda menor, de doentes, em que se determinou o SCC.

A comparação do valor preditivo da cintigrafia de perfusão miocárdica *versus* SCC em doentes assintomáticos com artrite reumatoide é importante dado o atual reconhecimento do diferente intervalo temporal a que corresponde a avaliação de risco estimado pelas duas técnicas (menor para a cintigrafia) (387) mas exige a realização de estudos prospetivos em amostras numerosas de doentes.

Mais recentemente, uma outra técnica de medicina nuclear, a **tomografia de emissão de positrões (PET)** permite uma medição precisa dos volumes do ventrículo esquerdo e a quantificação do fluxo sanguíneo (perfusão de sangue no miocárdio). A perfusão para o miocárdio pode ser avaliada de forma global, ou seja, o ventrículo esquerdo como um todo ou individualmente ao nível de cada um dos 17 segmentos padrão. A diminuição da perfusão miocárdica pode indicar a presença de doença arterial coronária obstrutiva ou um fluxo sanguíneo diminuído ao nível da microcirculação coronária. Estudos demonstraram a utilidade

da PET-TC para identificar placas ateroscleróticas com elevado risco de rotura em doentes com doença coronária e carotídea sintomática (388). Embora não esteja amplamente disponível, a PET pode ser utilizada em doentes com suspeita de angina (385). A PET também demonstrou prever a mortalidade cardiovascular em doentes com doença arterial coronária (389) e, potencialmente, pode ser aplicada na estratificação do risco cardiovascular de outros grupos de doentes de alto risco, como aqueles com artrite reumatoide (378). As suas principais limitações incluem o custo e a disponibilidade dos radiofármacos (378).

A **RM cardíaca** permite uma avaliação abrangente da estrutura e da função cardíacas sem exposição a radiação ionizante. De todas as modalidades de imagiologia cardiovascular é a que fornece a quantificação mais precisa e reproduzível dos volumes e da massa dos ventrículos esquerdo e direito, assim como da fração de ejeção (390). Uma vantagem desta técnica é a de permitir uma "caracterização do tecido" miocárdico uma vez que fornece informações detalhadas sobre a estrutura e composição do miocárdio ventricular, permitindo a deteção e o diagnóstico de uma ampla gama de doenças do miocárdio (391). Isto é geralmente conseguido com as imagens de realce tardio após gadolínio, que permitem detetar áreas de enfarte ou de fibrose focal (392). Além disso, formas de fibrose mais difusas podem ser avaliadas utilizando o chamado mapeamento em T1 (propriedade de relaxamento magnético do miocárdio) e a quantificação do volume extracelular (estimativa do volume extracelular como uma proporção do miocárdio) (393). Ambas as técnicas têm o potencial de poderem ser utilizadas quer no prognóstico quer no seguimento da progressão da doença ao longo do tempo e/ou após a introdução de uma nova terapêutica (394). A isquemia miocárdica pode também ser avaliada por esta técnica, avaliando a perfusão miocárdica em repouso e durante o stresse após um vasodilatador farmacológico (385). As suas principais limitações incluem o custo e contraindicações específicas (doentes com objetos metálicos retidos ou com próteses médicas metálicas antigas) (378).

Um estudo recente com ressonância magnética cardíaca mostrou que os 39 doentes com artrite reumatoide apresentavam valores mais elevados de volume extra-celular em T1 *versus* os controlos (395) e estes aumentos no volume extra-celular demonstraram estar associados a um aumento na mortalidade (396). Este parâmetro imagiológico poderá assim vir a ser usado como um "biomarcador" para prever o risco cardiovascular na artrite reumatoide, bem como para avaliar a resposta ao tratamento ao longo do tempo (397).

Num outro trabalho verificou-se uma redução da massa do ventrículo esquerdo, avaliada por ressonância magnética cardíaca, em 75 doentes com artrite reumatoide estabelecida *versus* controlos (398). Estes achados foram corroborados por um grande estudo de ecocardiografia

com 200 doentes (399), bem como nos resultados preliminares de um estudo de ressonância magnética cardíaca que avaliou doentes não tratados e com um diagnóstico de artrite reumatoide *de novo* (378).

No futuro, a ressonância magnética cardíaca perfila-se como uma técnica promissora na avaliação de doença cardiovascular (e do risco?) nos doentes com artrite reumatoide, assim como a PET e as técnicas híbridas, como a PET-TC e a PET-RM.

1.2.2. Papel dos biomarcadores

Relativamente à utilização de biomarcadores de risco de doença cardiovascular na artrite reumatoide (400, 401) desconhece-se se o seu uso é preferível às técnicas de imagiologia, e de que forma são superiores a outros fatores de risco tradicionais na predição de eventos cardiovasculares. A utilização de novos biomarcadores de risco na prática clínica requer uma investigação extensa e cuidadosa, requerendo uma compreensão do envolvimento desses mesmos marcadores nos diferentes mecanismos patogénicos da doença e a avaliação dos resultados da sua utilização em estudos prospetivos (362).

A nossa investigação constitui, certamente, um contributo na exploração de novos biomarcadores de risco cardiovascular em doentes com artrite reumatoide.

Com base nos nossos achados, é possível considerar a utilização na prática clínica de alguns biomarcadores num futuro painel de doseamentos séricos, incluindo nomeadamente: o BNP (já em uso laboratorial corrente), a razão OPG/RANKL, o DKK-1, a PCR (avaliada habitualmente no seguimento destes doentes), a ApoA1 e a razão ApoB/ApoA1 (ambas em uso laboratorial corrente).

O **NT-proBNP** já mostrou ser um bom biomarcador de mortalidade global e mortalidade cardiovascular na artrite reumatoide (157, 402). Na poliartrite inflamatória precoce, o NT-proBNP foi associado ao score de HAQ e à PCR (157), o que pode ser indiciador da relação entre o dano induzido pelas doenças inflamatórias crónicas nas articulações e o induzido no coração (miocárdico e/ou vascular). Nos nossos doentes com artrite reumatoide, com uma maior duração de doença, o BNP correlacionou-se pouco com o HAQ (correlação de Spearman, $r=0,1889$; $p=0,007$), mas níveis superiores a 100 pg/mL associaram-se fortemente à presença de defeitos de perfusão na cintigrafia de perfusão miocárdica, independentemente de fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

Este resultado corrobora a hipótese de que a cintigrafia de perfusão miocárdica pode revelar uma disfunção cardíaca subclínica neste contexto e apoia a utilização da determinação do BNP sérico como instrumento de rastreio na avaliação do risco de doença cardiovascular em doentes com artrite reumatoide. Esta hipótese precisa de ser validada em estudos prospetivos.

O maior obstáculo ao emprego de um painel de biomarcadores é o aumento muito provável dos custos envolvidos na estratificação de risco da doença cardiovascular, nomeadamente face à ecografia carotídea isolada. No entanto, da mesma maneira que a erosão óssea representa um evento tardio na artrite reumatoide, a presença de placa de ateroma já representa um processo aterosclerótico avançado (tardio) e, portanto, os biomarcadores poderão permitir de uma forma simples uma avaliação mais precoce de risco de aterosclerose potenciada no contexto da artrite reumatoide. Estes biomarcadores poderão reclassificar os doentes reumatóides em termos de grupos de risco de doença cardiovascular, permitindo identificar os de alto risco num estágio anterior ao aparecimento da placa.

1.2.3. Implementação de estratégias de avaliação de risco cardiovascular em doentes reumatóides

As novas recomendações EULAR para manejo do risco de doença cardiovascular na artrite reumatoide, preconizam que o rastreio ecográfico da presença de placas ateroscleróticas carotídeas assintomáticas possa ser considerado como fazendo parte da avaliação de risco de doença cardiovascular em doentes com artrite reumatoide (90). Contudo, a melhoria da estratificação de risco, por si só, não reduzirá as taxas de eventos cardiovasculares, a menos que seja acompanhada de uma gestão adequada do risco de doença cardiovascular na artrite reumatoide. Dados retrospectivos sugerem que a estratificação e a gestão do risco, não ocorrem (403) e que os fatores de risco tradicionais são subdiagnosticados e subvalorizados nos doentes com artrite reumatoide (3). Esta situação pode, por si só, contribuir para aumentar o risco de doença cardiovascular nesta população.

Outro problema na gestão do risco de doença cardiovascular na artrite reumatoide reside na falta de dados robustos que corroborem a eficácia dos fármacos cardioprotetores na prevenção de doença cardiovascular nesta população específica. Neste âmbito, é importante referir uma análise *post hoc* de dois ensaios prospetivos *de outcome* de doença cardiovascular, comparando tratamento intensivo *versus* um convencional com estatinas. Nesta análise, verificou-se que os doentes, com e sem doença articular inflamatória, apresentavam efeitos comparáveis em termos de redução dos níveis das frações lipídicas e de redução do risco de doença cardiovascular (404). Além disso, dados provenientes duma consulta preventiva de cardio-reuma, mostraram que 2/3 dos doentes que foram para aí encaminhados para avaliação de risco de doença cardiovascular, necessitaram de terapêutica de prevenção cardiovascular (405), o que reforça a necessidade de identificar os doentes de alto risco. Nessa consulta, e apesar da polimedicação destes doentes, o tratamento antilipidémico, com alvos terapêuticos específicos, foi bem-sucedido em cerca de 90% doentes com artrite reumatoide (405).

2. Dano articular na artrite reumatoide

A gravidade da artrite reumatoide não tem uma definição uniforme. Por exemplo, para o doente ela é muitas vezes definida pelo grau de dor ou fadiga e pelo grau de capacidade de realizar as atividades de vida diária e do trabalho. Por outro lado, os reumatologistas clínicos estão mais preocupados com o nível de inflamação (expresso pelo número de articulações inflamadas), os níveis dos reagentes de fase aguda e os índices de gravidade compostos, como os *scores* de atividade da doença. Os investigadores concentram-se em medidas de *outcome* que podem ser avaliadas objetivamente, como é o caso de a destruição articular e a mortalidade (406). Contudo, na sua essência, estas perspetivas são semelhantes, uma vez que os níveis de incapacidade funcional, de inflamação e de danos estruturais estão correlacionados (51). A inflamação e a destruição articulares desempenham um papel independente na incapacidade funcional física (407).

As flutuações na atividade da doença estão diretamente relacionadas com a progressão radiográfica, embora esta relação seja menos evidente sob determinados tratamentos específicos, como com os agentes anti-TNF α (408).

2.1. Progressão radiográfica

Para fins de investigação, a taxa de progressão do dano articular, visualizada através das radiografias das mãos e dos pés, é a medida de *outcome* mais comumente utilizada. A principal vantagem reside no facto de ela poder ser avaliada objetivamente, utilizando um método de pontuação validado. As radiografias podem ser classificadas pelo mesmo leitor, permitindo assim avaliar as variações intra-observador e inter-observador. Uma outra vantagem de medir a gravidade do dano articular é que este se acumula ao longo do tempo e, portanto, reflete a história da doença (409). Em resumo, a taxa de progressão da destruição articular correlaciona-se com a carga cumulativa da inflamação ao longo do tempo, está intimamente relacionada com a função física e outros *outcomes*, como a incapacidade no trabalho, e, além disso, é uma medição barata, que utiliza métodos de pontuação validados (409). Logo, ela constitui um objetivo abrangente em estudos observacionais.

A ausência ou presença de dano articular pode ser avaliada com base na presença ou ausência qualitativas de "erosão" ou de "doença erosiva". Este método qualitativo tem 2 desvantagens. Primeiro, o grau de dano articular não pode ser discernido. O facto de que 70%-75% dos doentes com artrite reumatoide precoce desenvolveram erosões nos primeiros anos de seguimento, indica que esta medida qualitativa é adequada em fases muito precoces da doença, mas não em estádios mais avançados (407). Além disso, a progressão do dano articular é frequentemente

linear nos primeiros anos e diminui à medida que a doença progride (410). Em segundo lugar, não existe uma definição uniforme para erosão ou doença erosiva. A realização de análises com medidas de *outcome* não validadas, aumenta a variação inter-observador e a variação entre os estudos. De facto, as várias descrições para artrite reumatoide erosiva incluem: qualquer evidência radiográfica de erosões (411), uma interrupção da cortical de 2 mm (412) e a presença de 2 ou 3 erosões (14). De acordo com os critérios ACR/EULAR de 2010, a doença erosiva típica é definida como a presença de uma interrupção da cortical em pelo menos 3 pequenas articulações das mãos ou dos pés. Esta condição foi associada a uma especificidade >85% para a prescrição de metotrexato e >90% para a persistência da doença (413).

O *score* SHS e o de Larsen modificado são os métodos de avaliação quantitativa, atualmente utilizados, para aferir a gravidade do dano articular na artrite reumatoide. Estas medidas quantitativas são mais discriminativas do que as medidas de resultado binário, foram validadas e podem ser utilizadas em todas as fases da doença (414). Tanto o *score* SHS como o Larsen são usados para avaliar as articulações das mãos e dos pés. Dos dois, o SHS é o único que diferencia as erosões ósseas e o dano da cartilagem, que por sua vez é quantificado como o estreitamento da interlinha articular. Em comparação com a pontuação de Larsen, o SHS é mais sensível para detetar mudanças ao longo do tempo, embora também seja mais difícil de aplicar (414). Por este motivo, no terceiro trabalho desta dissertação, optou-se por escolher o SHS como método quantitativo para traduzir a gravidade do dano estrutural na nossa amostra de doentes com artrite reumatoide.

Em estudos longitudinais, a taxa de progressão da destruição articular deve ser avaliada em vários pontos seriados no tempo, utilizando uma escala quantitativa, recorrendo a métodos de pontuação validados e a leitores treinados (409).

A correlação intra-paciente das medições em série é importante ao pontuar as radiografias. Ao contrário dos danos em radiografias de diferentes doentes, a gravidade do dano em radiografias seriadas do mesmo doente está altamente correlacionada. Este método de quantificação das radiografias em diferentes pontos do tempo para cada doente, comparado com a pontuação de radiografias em apenas um ponto no tempo, permite diminuir substancialmente a variação intra-doente na avaliação do dano articular. Consequentemente, a probabilidade de classificar o indivíduo erradamente (sob o ponto de vista fenotípico) é menor, sendo necessário incluir um menor número de doentes num estudo para se detetar uma diferença (415). Às vezes só está disponível apenas 1 radiografia por doente e o ponto do tempo em que as radiografias foram feitas pode variar de doente para doente. Além disso, uma vez que as radiografias são feitas em diferentes fases da doença, os *scores* não são facilmente comparáveis. Assim, e para estimar o efeito dos fatores de risco de dano articular quando existe apenas 1 radiografia, a progressão

radiográfica estimada por ano pode ser determinada dividindo a pontuação radiográfica total pela duração da doença no momento em que a radiografia foi realizada. Esta abordagem tem limitações pois pressupõe que o índice basal era zero e os cálculos são efetuados da mesma maneira para os doentes com artrite reumatoide precoce e para os com doença estabelecida, impedindo assim uma correta comparação das taxas estimadas de progressão radiográfica entre doentes distintos. Conforme já referido, a evolução do dano articular é frequentemente linear nos primeiros anos e depois diminui à medida que a doença progride (410). Assim, uma estimativa não exata da duração da doença terá sempre um impacto maior nos doentes com duração de doença mais curta, que ficam, consequentemente, com uma taxa anual de progressão radiográfica sobrestimada (409).

Atendendo a estes pressupostos, o 3º trabalho desta dissertação apresenta duas limitações principais: tem um desenho transversal e, portanto, é de qualidade inferior face a um estudo longitudinal; não foi avaliada a taxa de progressão do dano radiográfico como medida de *outcome*, mas apenas a gravidade do dano expressa pelo valor do *score* SHS. Esta segunda limitação foi atenuada com o ajuste para o *score* HAQ.

A opção de calcular a taxa de progressão radiográfica estimada, tendo em conta a data da radiografia e a duração da doença, poderia ter sido escolhida neste projeto, mas face às limitações já discutidas e ao facto de em Portugal existir um atraso significativo no diagnóstico da doença reumatoide (pelo reumatologista *versus* o início de sintomas compatíveis com a doença), não tornaria as nossas conclusões mais válidas.

Para discernir o papel de determinado biomarcador de risco de progressão do dano articular na artrite reumatoide, para além do ajuste para os efeitos das terapêuticas, é necessário ajustar para a idade e o sexo. O efeito confundidor do género é diferente consoante as coortes, mas o efeito confundidor da idade é consistente. Em quase todos os estudos, uma idade mais avançada no início está associada a uma evolução mais grave da doença (409). Na nossa amostra de doentes reumatoides e para a análise dos efeitos dos SNPs do LRP5 (o biomarcador genético analisado quanto a eventual valor como preditor da gravidade da artrite reumatoide), seleccionámos a idade aquando do diagnóstico de artrite reumatoide como factor de confusão em vez da idade atual do doente pois a primeira relacionava-se mais fortemente com os parâmetros do SHS ($r=-0,297$; $p<0,001$ *versus* $r=0,191$; $p=0,006$). Além disso, não seria correto incluir duas variáveis de idade no modelo multivariado. A opção pelo *score* de HAQ como covariável deveu-se ao facto de este índice ser uma tradução robusta de várias variáveis, nomeadamente, a atividade inflamatória acumulada ao longo do tempo, a duração da doença, a exposição e a duração da exposição aos diferentes fármacos utilizados para controlar a

atividade da doença. A inclusão do HAQ como covariável evitou comprometer a fiabilidade e a validade do modelo multivariado com muitas covariáveis.

2.2. Biomarcadores de gravidade de doença

Um biomarcador é definido como uma característica que pode ser medida objetivamente e avaliada como um indicador de um processo biológico normal ou patológico, também pode ser um indicador de resposta a uma intervenção terapêutica. Geralmente, os biomarcadores são classificados em 3 grupos: marcadores genéticos, marcadores serológicos e marcadores imagiológicos (409).

A OMERACT propôs uma definição muito mais rigorosa para um biomarcador na artrite reumatoide, ou seja, que deverá refletir os danos estruturais (416). A definição é baseada em 14 requisitos, que incluem não apenas critérios que garantem que o ensaio é confiável e que o marcador tem capacidade discriminativa, mas também itens que refletem "verdade". Nos critérios incluem-se os seguintes: evidência de que um biomarcador reflete a remodelagem do tecido, demonstrada em modelos animais; localização imuno-histoquímica nos tecidos das articulações e correlação entre os níveis do biomarcador e *scores* substitutos dos danos estruturais. Estes critérios OMERACT foram desenvolvidos para marcadores serológicos, mas também podem ser aplicados a outros tipos de biomarcadores (416).

Os fatores genéticos podem predispor a fatores de risco serológicos que, por sua vez, também são preditores da gravidade do dano articular, através de mecanismos conhecidos ou não. Além disso, os biomarcadores serológicos são produzidos sob a influência de fatores tanto genéticos quanto ambientais, como é o caso dos ACPAs. A sua presença está associada a uma evolução grave da doença reumatoide e certos alelos, nomeadamente, o HLA-DRB1, e o tabagismo predis põem ao desenvolvimento desses auto-anticorpos (417). As características imagiológicas também podem atuar como biomarcadores, pois podem indicar um determinado processo patológico. Entre estas 3 categorias de biomarcadores, os biomarcadores serológicos e de imagem são os mais próximos do fenótipo, isto porque as técnicas de imagem mais recentes permitem visualizar as características da doença subclínica (e clínica). Assim, e de um modo geral, quanto mais próximo do fenótipo um marcador é, maior a dimensão do seu efeito (409). De seguida, discutiremos as evidências dos diferentes biomarcadores genéticos, serológicos e imagiológicos preditores da progressão radiográfica na artrite reumatoide.

2.2.1. Biomarcadores genéticos

Estudos em gémeos indicaram que a progressão radiográfica na artrite reumatoide é em parte hereditária (409). Estudos recentes na população islandesa verificaram uma heritabilidade para

a progressão radiográfica na artrite reumatoide de 45% -58% (418). Os outros 42% -55% podem ser explicados, quer por fatores ambientais, quer pelo acaso (418).

O interesse no estudo dos fatores genéticos de suscetibilidade para a artrite reumatoide cresceu nos últimos anos, tendo já sido descritas mais de 40 variantes genéticas (419). A grande maioria foi identificada em estudos de todo o genoma avaliando milhares de casos e controlos (409). Por outro lado, a avaliação da relação de fatores genéticos com a gravidade da artrite reumatoide foi estudada através de comparações entre doentes, em estudos longitudinais e com *outcomes* a longo prazo (409). Contudo, a maioria dos estudos genéticos sobre a progressão do dano articular são relativamente pequenos e resultaram da investigação de genes candidatos (409). Esta foi também a nossa abordagem no terceiro trabalho desta dissertação. O gene do LRP5 afigurou-se como um excelente gene candidato, preditor da gravidade da evolução da artrite reumatoide, dado que a) na artrite reumatoide existe uma inibição da formação óssea e, consequentemente, da reparação das erosões ósseas articulares; b) a via de sinalização Wnt/LRP5/ β -catenina canónica tem uma importância comprovada na regulação da osteoblastogénese e, consequentemente da formação óssea; e c) a variabilidade genética do LRP5 tem sido associada a fenótipos ósseos extremos (240).

Um aspeto fundamental é saber quando existe de facto uma associação com fatores genéticos. Para tal, existem vários níveis de evidência possíveis. O primeiro nível é o valor p que, na opinião de muitos, é um nível insuficiente para indicar se a associação a uma variante genética é verdadeira. Em estudos de alta rentabilidade, onde muitas variantes são genotipadas e analisadas, os valores de $p < 5 \times 10^{-8}$ geralmente são considerados válidos. Este ponto de corte deriva da correção de Bonferroni, que se determinou da seguinte forma $0,05 \text{ (alfa)} // 500,000$ (número SNPs analisados). Se esse número de SNPs for realmente estudado, o valor de p reflete uma probabilidade $< 5\%$ de que a descoberta possa ser atribuída ao acaso (409). No entanto, o valor de p também é influenciado pela quantidade de indivíduos incluídos no estudo. Portanto, por um lado, um determinado valor de p , obtido num estudo que incluiu vários milhares de indivíduos, ainda pode indicar que a variante genética encontrada se deve ao acaso; por outro lado, um valor de p semelhante a esse ou até superior mas obtido num estudo contendo várias centenas de doentes pode ser indicativo de que estamos perante uma "variante genética verdadeira". Em suma, usar o valor de p como uma medida para avaliar se os achados são confiáveis ou não é espúrio (409). Um método mais confiável é a replicação. Se uma variante genética é associada estatisticamente a determinado *outcome* em várias coortes independentes, a probabilidade de a observação refletir uma descoberta forçada é muito reduzida (409). Os dados são ainda mais convincentes se eles forem suportados por um nível de evidência diferente, ou seja, variantes genéticas que se associam a mudança dos níveis de

expressão do ARNm ou da proteína. Contudo, as associações genéticas que não são suportadas por dados de expressão também podem ser genuínas, embora a presença de associações ao nível da expressão aumente a confiabilidade, constituindo um passo inicial para compreender melhor as consequências de ter uma determinada variante genética. A situação ideal é aquela em que são conhecidos a via ou o mecanismo através dos quais um determinado fator de risco genético influencia a doença (409).

No caso concreto da nossa investigação, ainda permanecem por esclarecer os efeitos funcionais dos três SNPs do LRP5 [rs3736228 (A1330V), rs4988321 (V667M) e rs2306862 (N740N)], que foram estudados como biomarcadores genéticos na nossa amostra de doentes reumatoides. Até à data ainda não dispomos de estudos que clarifiquem as alterações de expressão, em termos de ARNm e/ou de proteína, associadas a estes SNPs, com a exceção de algumas evidências recentes relativamente aos efeitos funcionais do SNP rs3736228 (A1330V) (266).

Durante as últimas duas décadas, muitos estudos avaliaram os marcadores genéticos associados à gravidade da artrite reumatoide. Os resultados obtidos foram muitas vezes inconsistentes, provavelmente devido ao pequeno tamanho da amostra e à utilização de diferentes tipos de medidas de *outcome* (409).

Os genes candidatos avaliados até à data podem ser categorizados em 3 grupos: marcadores associados à suscetibilidade de desenvolver artrite reumatoide, marcadores de inflamação e marcadores relacionados com o osso ou cartilagem.

2.2.1.1. Marcadores genéticos de suscetibilidade

Dentro dos marcadores de suscetibilidade para a artrite reumatoide, os alelos **HLA-DRB1**, que codificam o chamado epítipo partilhado, são o fator de risco genético mais antigo associado à progressão do dano articular. Este marcador é também o fator de risco genético mais amplamente validado. A presença de alelos do epítipo partilhado é um fator de risco para desenvolver ACPAs, que por sua vez também estão associados à progressão do dano articular (33). Curiosamente, num estudo recente sobre a progressão na artrite reumatoide ACPAs-negativa, a região HLA não foi identificada como um marcador para a progressão radiográfica, fornecendo evidências adicionais de que a relevância da região HLA-DRB1 para a progressão está efetivamente na predisposição ao desenvolvimento daqueles auto-anticorpos (409). A região HLADRB1 que codifica os alelos do epítipo partilhado pode também codificar a sequência de aminoácidos DERAA. A presença desta variante foi associada a um efeito protetor contra a progressão radiográfica numa única coorte (420). Os mecanismos pelos quais os alelos HLA-DRB1 predis põem ao aparecimento de ACPAs e à progressão do dano articular não estão ainda

completamente compreendidos, embora a hipótese mais plausível seja a de que essas variantes genéticas influenciam a resposta imune afetando o local de ligação ao antígeno (409).

Uma variante codificante (rs2476601) do **PTPN22** (um outro marcador de suscetibilidade para a artrite reumatoide) foi estudada em 8 populações, numa tentativa de estabelecer uma associação com a gravidade do dano articular. Embora o alelo *minor* tenha sido associado a uma progressão mais grave em 2 estudos (421, 422), os estudos subsequentes em 5 outras coortes não revelaram uma associação significativa (409).

Várias variantes genéticas na região **TNFAIP3-OLIG3** (*tumour necrosis factor alpha-induced protein 3 - oligodendrocyte lineage transcription factor 3*) estão associadas ao risco de desenvolver artrite reumatoide. A variante genética rs6920220 foi associada à progressão do dano articular num estudo do Reino Unido, que consistiu em 685 radiografias de 700 doentes com artrite reumatoide ACPAs-positiva (423). Num estudo holandês com 844 radiografias de 181 doentes com artrite reumatoide ACPAs-positiva, esta associação não foi replicada (424) assim como não o foi noutras coortes norte-americanas. Numa meta-análise de 7 coortes, a variante rs675520 naquela região não revelou associação significativa com a artrite reumatoide (425).

Existem dados publicados sobre o **C5-TRAF1** (gene do *Complement Component 5 -Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 1*), um outro marcador de suscetibilidade para a artrite reumatoide. Embora tenha sido observada uma associação significativa para a variante genética rs2900180 em 2 coortes do Reino Unido (426), este achado carece de replicação numa meta-análise. Inicialmente, foi observada uma associação positiva para uma outra variante nesta região, a rs10818488, no entanto, esta associação não foi replicada numa meta-análise de 7 coortes (425).

Uma variante genética no **CD40** (a rs4810485) mostrou ser um fator de risco para o desenvolvimento de artrite reumatoide ACPAs-positiva. Este marcador foi posteriormente estudado em relação à progressão radiográfica em 2 coortes de doentes reumatoides ACPAs-positivos. Em ambas se observou uma associação significativa. Curiosamente, o alelo *minor* que foi associado a uma diminuição do risco de desenvolver artrite reumatoide foi associado a uma progressão mais grave do dano articular. Até à data, não existe nenhuma explicação para esta observação (427).

O **IL2RA** (*interleukin 2 receptor alpha chain*), um outro marcador de suscetibilidade para a artrite reumatoide, foi também analisado, em zonas geográficas muito distintas. O polimorfismo rs2104286, que é encontrado no gene que codifica a cadeia α do recetor da IL2 (CD25), está claramente associado à progressão do dano articular. Foram demonstradas associações significativas em populações de doentes com artrite reumatoide da Holanda, da Islândia e da

América do Norte (409). Além disso, o alelo *minor*, que está associado a uma menor progressão da doença, foi também associado a níveis séricos mais baixos de IL2RA, que por sua vez se correlacionaram com a progressão (428). Uma análise multivariada, que incluiu o gene IL2RA e os níveis séricos de IL2RA, demonstrou que apenas estes estavam, de forma independente, associados à progressão da doença, sugerindo que a variante genética afeta a progressão por um mecanismo que também influencia os níveis séricos. A variante rs2104286 do IL2RA é a única variante genética, predisponente ao desenvolvimento e progressão da artrite reumatoide, para a qual existem dados funcionais disponíveis (409). Curiosamente, esta variante também predispõe a outros distúrbios auto-imunes, como a esclerose múltipla e a diabetes *mellitus* tipo 1.

2.2.1.2. Marcadores genéticos de inflamação

Na artrite reumatoide, o dano articular resulta duma inflamação desregulada e/ou de distúrbios na homeostasia do osso e/ou da cartilagem. A destruição articular no seu conjunto, tal como é visualizada nas radiografias de mãos e pés traduz a perda local de cartilagem e osso, secundárias à inflamação. A presença de auto-anticorpos específicos é responsável pela propagação do nível e da cronicidade da inflamação e pode afetar, direta e indiretamente, o grau de dano estrutural (206). Os genes que codificam os marcadores inflamatórios também podem influenciar o nível de inflamação e, portanto, foram alvo de estudos de como genes candidatos à progressão do dano articular na artrite reumatoide.

O **TNF α** e a **IL1** são marcadores pró-inflamatórios que estão aumentados na artrite reumatoide. Um número reduzido de grupos de investigadores focou-se em estudar as variantes do gene TNF α . A atividade da IL1 reflete a função de 2 moléculas, a IL1 α e a IL1 β . A IL1 α está ligada às células e a IL1 β é uma citocina segregada (409). Não foram reportadas quaisquer associações entre variantes no gene IL1A e a gravidade do dano radiográfico na artrite reumatoide. Para o gene IL1B, a variante rs16944 foi avaliada em 3 estudos, mas não foi observado qualquer efeito (409). Adicionalmente, num estudo com 297 doentes e 273 radiografias, encontrou-se uma associação significativa entre a variante rs1143634 do gene IL1B, por um lado, e os níveis séricos significativamente mais baixos de IL1Ra (*interleukin 1 receptor antagonist*) e a destruição articular, por outro (429). Em estudos posteriores (com 2762 doentes e 5956 radiografias) não se conseguiu replicar esta associação (409). Em suma, variantes dos genes TNFA, IL1B e IL1A não parecem predispor a uma artrite reumatoide destrutiva e grave.

Os SNPs dos genes **IL4** e *interleukin-4 receptor* (**IL4R**) foram estudados em várias populações de doentes com artrite reumatoide. O papel da IL4 é considerado relevante, pois promove principalmente a diferenciação das células T para células Th2. O papel da IL4 é ainda reforçado

pelos seguintes factos: ratos *knockout* para IL4 caracterizam-se por desenvolverem um dano articular extenso; a sinovial de doentes com artrite reumatoide estabelecida apresenta concentrações sinoviais baixas de IL4 (409). No entanto, não foram detetadas associações claras entre variantes genéticas no IL4 e a gravidade ou a progressão do dano articular no Homem (409). Efetivamente, o efeito da IL4 é mediado principalmente através da cadeia do IL4R. Um SNP que altera um aminoácido no IL4R (rs1805010) mostrou-se associado à presença de erosões, assim como a algumas implicações funcionais (430). No entanto, estudos subsequentes nas populações holandesa e britânica não conseguiram replicar esta associação da variante rs1805010 à progressão do dano articular (431, 432). Um estudo recente de marcação de SNPs do IL4R mostrou que 2 variantes do IL4R (rs1119132 e rs1805011) estavam associadas à progressão radiográfica, tendo esta constatação sido replicada de forma independente (432). Essas 2 variantes estavam em baixo desequilíbrio de *linkage* ($R^2 < 0,01$) com a variante rs1805010 (432). Não há dados disponíveis acerca da implicação funcional destas 2 variantes.

Adicionalmente, descobriu-se que a variante rs1800795 do gene **IL6** estava associada a um dano articular menos grave (422). Contudo, esta associação não foi replicada numa coorte holandesa, em que 3 outras variantes foram associadas à gravidade do dano articular (409). Duas destas últimas variantes foram significativamente associadas ao dano articular numa meta-análise que incluiu a coorte holandesa. Nesta mesma meta-análise, sem a coorte holandesa, a associação deixava de ser significativa (409). Com base nesta observação e na diferença de direção do efeito entre as coortes, não podem ser extraídas conclusões claras sobre as variantes genéticas do gene IL6 e o seu impacto na progressão do dano das articulações.

Várias linhas de investigação sugerem um papel importante para a **IL10** na patogénese da destruição articular na artrite reumatoide. Estudos pré-clínicos mostraram que a IL10 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias e a proliferação de células Th1. Num modelo de roedores com artrite crónica, a IL10 inibiu a gravidade da doença (433). O alelo *minor* de um polimorfismo do promotor na posição -1082 (rs1800896) foi associado a um dano articular menos grave numa coorte de 91 mulheres holandesas com artrite reumatoide (433). Esta observação foi replicada num estudo do Reino Unido (422). Além disso, foram observados efeitos num sentido semelhante em várias coortes, embora não significativos (409). Assim, seria interessante realizar uma meta-análise desta variante, especialmente, porque se verificou uma correlação entre a rs1800896 e a expressão de IL10 (doentes com o alelo de risco de gravidade produziram níveis mais baixos de IL10). Achados semelhantes foram obtidos pelo estudo dos haplótipos das variantes -1082A/G, -819C/T e -592A/C (434). Neste haplótipo, a variante -592 (rs1800872) ($R^2 = 0,29$ com rs1800896) também apareceu associada à gravidade do dano articular num estudo (434), embora outros estudos não apoiem este achado (422, 434). Os

estudos de associação de genoma completo mostraram também que as variantes do gene IL10 eram um fator de risco relevante para doença de Crohn e a doença de Behçet (409).

Os níveis de **IL15** encontram-se elevados no soro, na sinovial e na medula óssea de doentes com artrite reumatoide. A IL15 influencia a resposta imune inata e adaptativa e é, principalmente, responsável pela ativação e proliferação das células T. Dados recentes mostram que esta citocina influencia a osteoclastogénese (409). Uma abordagem de marcação genética com vários SNPs revelou que várias variantes no gene IL15 se associavam à gravidade da progressão do dano articular (409). Além disso, numa meta-análise de 4 coortes, 4 variantes deste gene foram associadas à progressão (435).

A família dos *Fc receptor-like* possui funções imunorreguladoras potenciais. O gene *Fc receptor like 3* (**FCRL3**) foi alvo de estudo, já que está associado a várias doenças auto-imunes (409). Em doentes asiáticos, observou-se que constitui um fator de risco para o desenvolvimento de artrite reumatoide. Ele é preferencialmente expresso nas células B, e o alelo -169C de FCRL3 (rs7528684) foi associado a níveis mais elevados de ACPAs (409). Num estudo coreano, doentes com artrite reumatoide e com o genótipo CC mostraram taxas de progressão radiográfica mais elevadas (436). Num estudo norueguês, os doentes ACPAs-positivos e com o genótipo CC também apresentaram uma progressão mais grave (437). Numa grande coorte holandesa, não foi observada qualquer associação entre os genótipos FCRL3 e a progressão radiográfica na artrite reumatoide ou na artrite reumatoide ACPAs-positiva (409). Uma meta-análise destes dados é imperiosa para tirar conclusões definitivas.

Finalmente, a variante **TGF1** -869T/C mostrou-se um fator de suscetibilidade para a artrite reumatoide na população japonesa (438). Posteriormente, esta variante foi relacionada com a gravidade do dano articular e foi investigada em 2 estudos. No estudo coreano, nenhuma associação significativa foi observada (439). No estudo do Reino Unido, encontrou-se uma associação entre essa variante e o dano articular, embora a associação não tenha sido significativa quando a duração da doença no momento em que as radiografias foram adquiridas foi incluída na análise (440). Face ao exposto, esta variante não parece estar associada à gravidade do dano articular.

2.2.1.3. Marcadores genéticos do osso e cartilagem

A destruição do osso ou da cartilagem e a capacidade do osso e da cartilagem resistirem à pressão inflamatória podem ser parcialmente explicadas pela constituição genética do indivíduo doente.

O equilíbrio entre a atividade osteoblástica e a osteoclástica é crucial para um osso saudável, e a perda óssea relacionada com os osteoclastos é mediada pela via **OPG/RANK/RANKL/TRAFF6**,

tal como já foi intensivamente revisto na Introdução desta tese. O RANKL é expresso e libertado pelos osteoblastos e pelos linfócitos T ativados. O RANKL promove a formação dos osteoclastos e perpetua a sua função e sobrevivência através da ligação ao RANK. Posteriormente, o sinal RANK é mediado pelo TRAF6, um membro da família do *TNF receptor associated factor* (TRAF), que funciona como um transdutor de sinal na família NF- κ B (409). O processo de formação dos osteoclastos e a consequente reabsorção óssea são regulados negativamente pela OPG, uma vez que a ligação da OPG inibe a ativação do RANKL (409). A perda óssea na artrite reumatoide aponta para um desequilíbrio neste eixo OPG/RANKL, favorecendo a reabsorção óssea e resultando em erosão. Este desequilíbrio potencial é suportado pela evidência da associação da razão OPG/RANKL no soro à destruição articular na artrite reumatoide (409). As variantes nos genes OPG, RANK e RANKL têm sido associadas à densidade mineral óssea e à osteoporose. O TRAF6 foi também identificado como um fator de risco para o desenvolvimento de artrite reumatoide. As variantes que marcam estes 4 genes foram avaliadas recentemente num estudo de genes candidatos (409). As variantes que foram significativamente associadas na primeira coorte foram posteriormente estudadas em 3 coortes adicionais (409). Nenhuma das variantes dos genes RANK, RANKL ou TRAF6 foi replicada após a correção para testes múltiplos, embora 1 variante no gene OPG, a rs1485305, tenha sido significativamente associada a dano articular mais grave numa meta-análise das 4 coortes e novamente após a correção de Bonferroni. Esta variante também foi associada à perda de densidade mineral óssea (409).

A via Wnt/ β -catenina é uma outra via extremamente relevante para a homeostasia do osso. Esta via envolve a ligação de proteínas Wnt a um complexo de co-receptores que compreende o LRP5 ou o LRP6 e um membro da família de proteínas *frizzled*, como já foi referido na Introdução desta tese. Esta ligação leva a uma cascata de sinalização que resulta na libertação de β -catenina no citoplasma, o que vai estimular a diferenciação dos osteoblastos. A cascata é regulada negativamente pelo DKK-1 e pela esclerostina. O DKK-1 também se pode ligar ao recetor da superfície celular *kringle containing transmembrane protein 1* (KREMEN1), além de se ligar ao LRP5, o que fortalece o seu efeito regulador negativo (409).

Na literatura, existe apenas um estudo de genes candidatos, em 4 coortes, avaliando a associação de variantes genéticas em genes que codificam proteínas cruciais na via de Wnt/ β -catenina (**DKK-1, SOST, LRP-5 e KREMEN1**), com destruição articular na artrite reumatoide (238).

Curiosamente, a publicação deste estudo, em 2013, é posterior à data do projeto que norteia esta dissertação e no qual preconizámos precisamente o estudo desta via de sinalização.

Na primeira fase deste estudo longitudinal, numa coorte de Leiden, envolvendo 600 doentes com artrite reumatoide, as análises exploratórias revelaram que seis (de 8) SNPs do DKK-1, três

(de 9) do SOST, um (em 16) do KREMEN1 e 10 (de 44) do LRP5 foram significativamente associados à progressão do dano radiográfico articular (238). Os 10 SNPs do LRP5, que num modelo de regressão multivariada (após o ajuste para a idade, o sexo e as estratégias de tratamento), foram significativos são: rs3736228 (A1330V), rs4988321 (V667M), rs1996, rs3781579, rs2510389, rs312023, rs4988331, rs12804775, rs546803 e rs2277268 (238).

Os nossos resultados estão em linha com estes, já que encontramos associações significativas de genótipo TT para o SNP A1330V do LRP5 com o SHS total, o *score* de erosões, o *score* de erosões das mãos e o *score* de estreitamento da interlinha articular dos pés (os últimos três são itens parciais totais do SHS) e do genótipo AG para o SNP V667M do LRP5 com o *score* de estreitamento da interlinha articular das mãos (também um item parcial total do SHS), independentes da idade à data do diagnóstico da artrite reumatoide e do *score* de HAQ, para ambos os polimorfismos. O resultado obtido relativamente aos SNPs rs3736228 (A1330V) e rs4988321 (V667M) do LRP5, corrobora a hipótese do LRP5 ser um biomarcador genético de progressão radiográfica na artrite reumatoide. Muito recentemente, em 2017, um estudo de análise integrada revelou alguns aspetos funcionais do SNP rs3736228 (A1330V) do gene LRP5. Este parece condicionar a expressão de 2 genes (*carnitine palmitoyltransferase 1A*, CPT1A; *metallothionein-like 5*, MTL5), funcionando como um regulador com efeito *cis* da transcrição de ARNm destes dois genes (266). O CPT1A facilita a transferência de ácidos gordos de cadeia longa através da membrana mitocondrial para sofrerem a β -oxidação (441). O MTL5 regula o crescimento e diferenciação celulares (442).

Estudos anteriores mostraram que os genes CPT1A e MTL5 (443) se associavam à DMO da coluna lombar. Quando comparados indivíduos com DMO elevada *versus* DMO baixa, a expressão destes genes em linfócitos B e monócitos (reguladores importantes da osteoclastogénese) encontrava-se aumentada nos primeiros (444).

O CPT1A está localizado na *BIOCARTA_LEPTIN_PATHWAY*, que também é importante na biologia e na etiologia da osteoporose (445). O SNP rs3736228 está localizado numa região *nonsynonymous* e condiciona a alteração dos resíduos de aminoácidos de Alanina (A) para Valina (V) da proteína LRP5, com alteração da sua estrutura secundária (perda da alfa-hélice e o ganho duma cadeia beta antes da mutação *missense*) (266).

No entanto, ao contrário do nosso estudo, de Rooy e colegas não avaliaram o SNP rs2306862 (N740N) do LRP5. Na nossa amostra de doentes reumatoides, o genótipo TT para este último SNP foi significativamente associado ao SHS total, ao *score* de erosões, ao *score* total das mãos e ao *score* de erosões das mãos, independentemente da idade ao diagnóstico da artrite reumatoide e do *score* de HAQ.

Na segunda fase do estudo de Rooy e colegas, os SNPs que se associaram significativamente à progressão do dano das articulações na primeira fase (coorte de Leiden) foram subsequentemente genotipados em três outras coortes longitudinais de doentes com artrite reumatoide [de Groningen (Holanda), Sheffield (Reino Unido) e Lund (Suécia)] e os dados obtidos, juntamente com aqueles da coorte de Leiden, foram resumidos numa meta-análise de efeitos fixos com ponderação da variância inversa (238). A opção por esta análise estatística deveu-se a vários fatores: as três coortes estudadas na fase 2 continham menos doentes e menos exames de raios X do que a coorte da fase 1, com um poder insuficiente para replicar achados em cada coorte individualmente ou em conjunto; as diferenças nos projetos de cada estudo tornaram impossível combiná-los diretamente numa análise única (238).

Três SNPs do DKK-1 (rs1896368, rs1896367 e rs1528873) foram significativamente associados à progressão do dano articular, mesmo após a correção para testes múltiplos, e os níveis séricos de DKK-1 foram significativamente correlacionados com os genótipos no SNP rs1896368 ($p=0,02$). Na segunda fase do estudo, devido a dificuldades técnicas, apenas um (rs3736228) dos 10 SNPs do LRP5, significativos na primeira fase do estudo, pôde ser genotipado nas outras três coortes, não tendo mostrado associação significativa com a progressão do dano articular radiográfico assumindo um modelo aditivo ($p=0,063$). Assim sendo, esta meta-análise é insuficiente para retirar conclusões definitivas quanto ao papel do LRP5 na progressão do dano articular. Não é demais sublinhar que outra diferença do nosso estudo, face ao anteriormente mencionado, é que nós avaliámos a gravidade do dano articular radiográfico em doentes com artrite reumatoide de forma transversal e não a progressão do dano articular radiográfico, que é longitudinal por definição.

As variantes genéticas do KREMEN1 foram exploradas, mas não se associaram à gravidade da progressão do dano articular. No entanto, várias variantes no DKK-1 (rs1896368, rs1896367 e rs1528873) e no SOST (rs4792909 e rs6503475) mantiveram-se associadas à progressão do dano estrutural, após a já referida meta-análise (238). Em particular, quando os alelos de risco de gravidade de ambas as variantes estavam presentes, observou-se uma interação gene-gene e os pacientes com 4 alelos de risco tiveram progressão muito grave (238). A relevância das variantes genéticas do DKK-1 foi fundamentada pela descoberta de que os genótipos de risco estavam associados a níveis mais elevados de DKK-1 no soro e que níveis séricos mais elevados estavam associados a dano articular mais severo noutros estudos (238). Estes dados fundamentam a relevância do DKK-1 para a progressão do dano articular (238).

A **ADAMTS5** (*ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 5*), anteriormente conhecida como agrecanase 2, é um membro da grande família ADAMTS de proteases dependentes do zinco. O agrecano, por sua vez, é um importante proteoglicano, responsável

pela compressibilidade e rigidez da cartilagem (409). Uma das primeiras alterações observadas na artrite é a depleção de agregano da cartilagem devido ao aumento da clivagem proteolítica no domínio interglobular. Foram identificados dois sítios principais de clivagem e a ADAMTS5 separa o agregano num desses sítios, segundo estudos em modelos animais de osteoartrose e de artrite inflamatória (409). Com base na hipótese de que variantes do gene ADAMTS5 possam influenciar a gravidade da progressão do dano articular, um estudo de gene candidato foi realizado em 4 coortes que foram classificadas de acordo com o método de SHS (em que o *score* de estreitamento da interlinha articular reflete a gravidade da perda de cartilagem). Contudo, não foram observadas associações claras nos 1418 pacientes e 4885 radiografias estudadas (409).

A granzima B (**GRZB**) é uma serina protease que se encontra em grânulos líticos das células NK e dos linfócitos T citotóxicos (446). Estudos *in vitro* mostraram que a granzima B possui atividade enzimática para desagregar o agregano em culturas de matriz de cartilagem (446). Em doentes com artrite reumatoide, constatou-se que a perda de proteoglicanos da cartilagem é um evento precoce no decurso da artrite destrutiva e que muitas células granzima B positivas estão presentes no *pannus* reumatoide (446). Estes factos, fizeram aumentar o interesse no gene GRZB como biomarcador para a progressão do dano articular. Foram estudadas quatro coortes tendo um polimorfismo (rs8192916) mostrado aumentar o risco de uma artrite reumatoide de evolução mais destrutiva (446). Além disso, o mapeamento em sangue total da expressão de *loci* de características quantitativas revelou que os alelos de risco estavam também associados a níveis mais altos de expressão de ARNm (446).

Além disso, temos as **MMPs**, que compreendem um grupo de enzimas dependentes do zinco e do cálcio, que estão implicadas na destruição da cartilagem articular e do osso. A MMP3 está presente, em abundância, no líquido sinovial e na sinovial dos doentes com artrite reumatoide e é considerada a principal MMP no processo de degradação da cartilagem. Ela é produzida pelos fibroblastos, sinoviócitos e condrócitos e ativa outras MMPs, como a MMP9 e a MMP2 (409). Os níveis séricos de MMP3 encontram-se elevados tanto na artrite reumatoide precoce como na estabelecida, relacionando-se com um dano articular mais grave (409). Dois estudos reportaram uma associação significativa entre o polimorfismo 5A/6A do promotor e a destruição articular em doentes reumatoides (447, 448). Um terceiro estudo não encontrou esta associação específica, mas identificou um haplótipo na mesma região génica que predispõe a uma destruição articular mais grave (449). Outros autores mostraram uma associação entre o polimorfismo 5A/6A e os níveis séricos de MMP3, descobrindo assim que este polimorfismo no promotor era funcionalmente relevante (409).

Ainda relativamente à MMP9, foi identificada recentemente uma variante genética (rs11908352) de risco para a progressão do dano articular. A variante foi identificada através da avaliação de SNPs de 186 *loci* associados a doenças auto-imunes e incluídos no *ImmunoChip*. O rs11908352, apesar de estar localizado perto do CD40, revelou ter uma associação à progressão do dano articular independente das variantes do gene CD40. Além disso, o alelo de risco para a gravidade do dano foi também associado a níveis séricos mais elevados de MMP9 no início da doença reumatoide (450).

Além dos estudos de genes candidatos descritos anteriormente, um estudo de todo o genoma investigou o subgrupo de artrites reumatóides ACPAs-positivas. O estudo foi realizado em 3 etapas. Na primeira etapa, um conjunto de SNPs localizados no cromossoma 2q34 foram associados à progressão do dano articular. Na segunda e terceira etapas, o rs7607479 foi replicado como um fator de risco para a progressão. O efeito foi protetor, pois os doentes portadores do alelo *minor* apresentaram dano articular menos grave (451). Este polimorfismo está localizado dentro do gene que codifica o *sperm-associated antigen 16* (**SPAG16**). Este gene é expresso nos sinoviócitos semelhantes a fibroblastos articulares (451). Foi demonstrado que estes últimos quando portadores do alelo *minor* expressavam e segregavam menos MMP3 (451). Além disso, verificou-se que os doentes com artrite reumatoide com o alelo *minor* apresentavam níveis séricos mais baixos de MMP3. Posteriormente, os níveis séricos de MMP3 foram associados à gravidade do dano articular (451). Estes dados são ainda suportados pelos resultados de uma análise multivariada, que mostrou que quando a variante genética do SPAG16 e os níveis séricos de MMP3 foram incluídos no modelo, apenas os níveis séricos foram independentemente associados à progressão do dano articular. Assim, o efeito do rs7607479 sobre o dano articular é mediado através de seu efeito na produção do MMP3 (451).

Em suma, podemos afirmar que muitos estudos avaliaram a importância de fatores genéticos como fatores de risco/biomarcadores para a progressão da destruição articular na artrite reumatoide. O número de doentes e radiografias incluídos em muitos desses estudos foi relativamente baixo e, uma vez que os marcadores genéticos geralmente têm efeitos pequenos em distúrbios complexos, o poder de muitos destes estudos é também baixo. Portanto, são necessárias meta-análises que combinem dados das várias coortes disponíveis, de forma a tirar conclusões robustas (409). Das variantes genéticas enumeradas, seria particularmente interessante combinar os dados disponíveis das variantes rs2900180 no gene C5/TRAFF1, rs1800896 no gene IL10, rs1800795 no gene IL6 e rs758684 no gene FCLRL3. Além disso, seria útil uma validação adicional da associação da variante 5A/6A no gene MMP3 com o dano articular em populações maiores (409).

Nas várias meta-análises realizadas e publicadas e em todas as coortes incluídas, a gravidade da progressão do dano articular foi medida quantitativamente (*scores* SHS e Larsen) (409). Da revisão dos vários estudos independentes e das meta-análises (409), constata-se que variantes polimórficas de 10 genes foram significativamente associadas à progressão do dano articular. Estas variantes estão relacionadas com a inflamação (por exemplo, IL2RA, IL4R e IL15), a auto-imunidade (por exemplo, HLADRB1), a homeostasia óssea (por exemplo, DKK-1, SOST e OPG) e com a destruição da cartilagem (por exemplo, GRZB). Algumas dessas variantes genéticas também foram associadas a diferentes níveis de expressão das respetivas proteínas no soro e plasma sanguíneos (por exemplo, IL2RA, DKK-1, MMP9 e GRZB) (409).

Os resultados obtidos na nossa amostra de doentes reumatoides ao replicarem as evidências dos SNPs rs3736228 (A1330V) e rs4988321 (V667M) do LRP5 e ao adicionarem uma nova evidência para o SNP rs2306862 (N740N) do LRP5, associados à recente descrição de aspetos funcionais do SNP rs3736228 (A1330V), reforçam o nível de evidência para este biomarcador genético (LRP5) em termos de progressão radiográfica na artrite reumatoide, pelo que propomos aumentar assim a lista das variantes polimórficas de relevo para 11 genes.

2.2.2. Biomarcadores serológicos

Por outro lado, os marcadores serológicos associados à gravidade da doença incluem auto-anticorpos, outros marcadores relacionados com a inflamação, proteínases e componentes da matriz extracelular do osso e da cartilagem.

Muitos estudos mostraram que tanto o **FR** como os **ACPAs** estão independentemente associados a uma doença mais destrutiva (409). Contudo, outros auto-anticorpos foram também estudados neste contexto, nomeadamente, os diretamente dirigidos contra a PADI4 (409). As PADs são enzimas que catalisam a reação de citrulinização (409). A PADI4 foi detetada na sinovial inflamada e os **anticorpos anti-PADI4** foram associados ao dano articular e às erosões num único estudo transversal (452), que não teve confirmação até à data. Nos novos auto-anticorpos associados à artrite reumatoide também se incluem os **anticorpos anti-Carp**. A carbamilação é uma modificação pós-tradução das proteínas (409). Esta reação está aumentada em fumadores, em doentes com insuficiência renal e na inflamação (crónica) (409). Em doentes ACPAs-negativos, estes anticorpos anti-Carp foram associados à gravidade da destruição articular numa população de doentes com artrite reumatoide precoce (453). Esta associação também não foi replicada, pelo que o valor destes novos anticorpos como biomarcadores para a progressão do dano articular na artrite reumatoide permanece indeterminado.

As proteínas de fase aguda, **PCR** e **VS** estão associadas à gravidade da doença, uma vez que a artrite reumatoide é uma doença inflamatória crónica. No entanto, estes marcadores explicam

apenas uma fração da variância total na destruição articular. Num estudo recente, determinou-se que apenas 15 a 19% da variação da destruição articular é explicada pela inflamação cumulativa (área sob a curva dos níveis de PCR em série ao longo do tempo) (454). Por isso, outros marcadores ou processos podem desempenhar um papel importante neste contexto. Por exemplo, há uma forte evidência de que os níveis séricos de **MMP3** estão associados à progressão do dano articular, uma vez que uma associação positiva foi relatada em 8 dos 9 estudos. Além disso, os níveis séricos de MMP3 mantêm-se aumentados ao longo do curso da doença, tornando-o um biomarcador “estável” de progressão radiográfica (455).

Os telopeptídeos carboxi-terminais (*C-terminal crosslinking telopeptide*) urinários do colagénio tipo I (**CTX-I**) e do colagénio tipo II (**CTX-II**) são marcadores de degradação óssea e cartilaginosa, respetivamente. O CTX-I foi associado à gravidade do dano articular em todos os estudos que avaliaram este parâmetro (456, 457). Apenas um estudo não conseguiu verificar esta associação, embora, neste estudo tenha sido avaliada a presença e não a gravidade da doença erosiva (458). Curiosamente, o CTX-I foi um preditor da progressão do dano articular, independente do FR, do score da atividade da doença e da VS (409). O CTX-II é um marcador específico da degradação do colagénio tipo II na cartilagem. A excreção de CTX-II foi preditiva do dano articular futuro, independentemente de outros marcadores inflamatórios (456, 459). Contudo, nenhum dos estudos anteriores fez ajustes para os ACPAs.

A piridinolina (**PYD**) é um composto principal nas ligações cruzadas das fibras de colagénio da cartilagem, mas também está presente no colagénio do osso e no tecido sinovial (409). Os níveis séricos de piridinolina são maiores em doentes com artrite reumatoide do que em indivíduos saudáveis e doentes com outras doenças reumáticas (409). Além disso, alguns estudos transversais revelaram que os níveis de piridinolina são maiores nos casos de artrite reumatoide ativa ou grave (409). Adicionalmente, foram realizados estudos prospetivos, baseados na determinação dos níveis séricos e urinários de piridinolina, que verificaram um aumento em ambos os tipos de marcador (sérico e urinário) em doentes que desenvolveram maior destruição articular (458-461). Curiosamente, a piridinolina sérica foi igualmente preditiva nos estádios precoce e avançado da artrite reumatoide, sugerindo que se trata de um biomarcador da gravidade do dano articular na artrite reumatoide estável (461).

A proteína oligomérica da matriz da cartilagem (*cartilage oligomeric matrix protein*) (**COMP**) é fortemente expressa na matriz de condrócitos. A elevação dos seus níveis séricos constitui um marcador de doença reumatoide mais destrutiva (409). Associações significativas foram estabelecidas em estudos relativamente pequenos, não tendo sido determinado se a associação entre a COMP e os danos articulares era independente de outros biomarcadores (409, 462). No estudo mais extenso (com 183 doentes com artrite reumatoide), os níveis séricos da COMP

foram preditores independentes do dano articular aos 5 anos de doença; contudo, após 10 anos de doença, essa associação perdeu-se e apenas os ACPAs e a PCR se associavam de forma independente à gravidade do dano articular das mãos e dos pés (462).

Relativamente ao *tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP1)*, não se sabe se é ou não um biomarcador para a artrite reumatoide grave e destrutiva. Dois estudos foram publicados, ambos com o score Larsen como *outcome* quantitativo, com resultados contraditórios entre si (409).

A **OPG** é um recetor solúvel, produzido pelos osteoblastos, que inibe a diferenciação dos precursores dos osteoclastos pela neutralização do RANKL(409). Embora um estudo inicial tenha constatado que os níveis séricos de OPG se associavam com o dano articular na artrite reumatoide (409), um estudo posterior revelou que a razão **RANKL/OPG** é que era particularmente preditiva da destruição articular (463, 464).

O **CXCL13**, também conhecido como *B lymphocyte chemoattractant*, interage com o seu recetor, o CXCR5, que é expresso pelas células B e pelas *follicular B helper T cells*. Os osteoblastos humanos expressam o CXCR5 (*C-X-C chemokine receptor type 5*) em abundância e a sua ativação pelo seu ligando CXCL13, induz a libertação de enzimas de degradação da matriz extracelular. Os doentes com artrite reumatoide apresentam níveis séricos elevados de CXCL13, o que permite especular sobre o seu papel no processo de remodelação óssea. Em 2 coortes holandesas, níveis séricos elevados de CXCL13 mostraram-se associados a uma destruição articular mais grave ao longo do tempo, particularmente no subgrupo de doentes reumatoides anti-CCP2-negativo (465).

A **IL2RA** (CD25) é expressa em muitas células imunes e é mensurável no soro após sofrer clivagem da membrana, sendo considerada um marcador de proliferação das células T (409). Na artrite reumatoide, o aumento dos níveis séricos de IL2RA foi associado a um dano articular mais grave (428). Se esta associação vier a ser replicada noutras coortes, este biomarcador, mais facilmente mensurável do que a variante genética, poderá tornar-se relevante na prática clínica.

2.2.3. Biomarcadores imagiológicos

As técnicas de imagem mais frequentemente investigadas com o intuito de prever a destruição articular radiográfica em doentes com artrite reumatoide são a RM e a ecografia (409).

A RM é cada vez mais utilizada para avaliar estados de doença e resposta ao tratamento, sobretudo na investigação. A RM tem importantes vantagens em relação às radiografias convencionais, nomeadamente, porque permite visualizar e quantificar a inflamação da sinovial, dos tendões e do osso (edema da medula óssea), bem como os danos estruturais (466). O edema medular ósseo é comum na artrite reumatoide e estima-se que ocorra em 68%-75% dos doentes

com artrite reumatoide precoce (466). O edema da medula óssea não é detetável por ecografia ou outras modalidades de imagem e é um forte preditor de progressão para erosão. Em ensaios controlados e aleatorizados, demonstrou-se que o edema medular ósseo é um preditor independente da progressão radiográfica aos 2 anos (coeficiente, 0,59-0,75; $p<0,001$; $R^2=25\%$ - 41%) e aos 5 anos (coeficiente, 0,83; $p<0,001$; $R^2=23\%$) (195, 467). Numa coorte observacional de artrite precoce, verificou-se que o edema medular ósseo basal é um preditor independente quer da progressão radiográfica das erosões ($OR=2,8$; $p=0,04$) quer da progressão avaliada por RM ($OR=1,3$; $p=0,04$) a 1 ano (409). Num outro estudo observacional, também se demonstrou que as erosões radiográficas após 1 ano de seguimento são mais frequentes nos doentes que apresentavam uma pontuação total basal de RM >13 ($OR=12,4$; $p=0,002$) (468). Além disso, observou-se que o edema medular ósseo basal é preditor da gravidade da destruição radiográfica aos 6 anos ($R^2=0,20$; $p=0,01$) (469). Outros investigadores verificaram que o edema medular ósseo na RM se associava a um RR de 4,0 de progressão para erosão radiográfica a 1 ano em doentes com artrite precoce, mas o RR aumentava para 12,1 na presença de erosão na RM (470). Noutra coorte observacional de artrite precoce, demonstrou-se uma relação clara entre a sinovite na RM basal e o subsequente desenvolvimento de erosões na RM (área abaixo da curva para a sinovite na RM, $r=0,42$, $p<0,007$) (471). Também, outros investigadores mostraram que a sinovite basal na RM prevê de forma independente a progressão radiográfica aos 3 anos ($\beta=0,14$; $p=0,03$) (472).

Em suma, todos estes estudos confirmaram que a presença de sinovite e edema medular ósseo na RM são preditores de progressão radiográfica em doentes com artrite reumatoide precoce. É de salientar que o número de doentes incluídos nestes estudos foi relativamente baixo, mas o efeito observado foi grande.

Por outro lado, nem todos os estudos conseguiram identificar uma associação entre os marcadores de inflamação na RM e a destruição das articulações radiográficas (409). Na maior parte dos casos isto ficou-se a dever a um tempo de seguimento muito curto (assumindo-se que o edema medular ósseo é uma lesão pré-erosiva e que leva algum tempo até que evolua de osteíte para erosão).

A RM é uma técnica consideravelmente mais sensível do que a radiografia convencional; assim, a maioria das novas erosões radiográficas (78%) foram visualizadas pelo menos 1 ano antes pela RM e a deteção de novas erosões na RM precede a sua deteção radiográfica numa mediana de cerca de 2 anos (473). Numa amostra de 16 doentes com artrite reumatoide, outros investigadores mostraram que 41% das erosões na RM basal só foram observadas na radiografia convencional 7 anos depois (474). Embora nem todas as lesões de edema medular ósseo evoluam para erosão na radiografia, a maioria dos estudos mostra que o desenvolvimento de

erosões radiográficas no curto prazo é altamente improvável na ausência de alterações inflamatórias basais na RM. Assim e para a presença de edema medular ósseo na RM basal, encontrou-se um valor preditivo positivo de 0,53 e um valor preditivo negativo de 0,92 para o aparecimento de erosões radiográficas ao fim de um ano (468). Outros autores reportaram achados similares mas apenas nas articulações metatarso-falângicas de doentes com artrite reumatoide (409).

Embora a RM seja a melhor técnica para a avaliação da inflamação e dos danos estruturais na artrite reumatoide, não é utilizada por rotina devido à sua disponibilidade limitada e aos custos elevados. A ecografia está mais disponível, é menos dispendiosa e não requer a administração de meio de contraste. A ecografia pode ser usada para avaliar a inflamação das articulações e dos tendões e as erosões. A sinovite é geralmente graduada de uma forma semiquantitativa (escala de cinzentos) e a atividade é aferida pelo *power Doppler* (409).

Num estudo observacional, a sinovite avaliada por ecografia mostrou-se um preditor da progressão das erosões visualizadas por RM a 1 ano (OR=2,01, $p=0,02$) (475). Num outro estudo, em doentes reumatoides, antes de iniciarem um agente anti-TNF α , a sinovite na ecografia basal também se associou a um risco aumentado de progressão estrutural radiográfica. Contudo, a capacidade de os exames ecográficos predizerem essa mesma progressão estrutural não foi superior ao exame clínico (476).

A presença de tenossinovite do extensor cubital do carpo, avaliada ecograficamente, mostrou também ser um preditor imagiológico independente da progressão das erosões, avaliadas por RM numa outra coorte (477).

A ecografia apresenta uma maior sensibilidade que a radiografia convencional na deteção de erosões ósseas no contexto da artrite reumatoide precoce, em consequência, muito provavelmente, do tamanho das erosões. Num estudo em 16 doentes com artrite reumatoide, demonstrou-se que 22% das erosões presentes na ecografia basal só foram observadas em radiografia 7 anos após; esta percentagem foi menor do que aquela detetada por RM (474).

A ecografia é uma técnica limitada pela sua capacidade de detetar lesões em alguns locais, como é o caso do punho e das superfícies intra-articulares da terceira e quarta articulações metacarpo-falângicas; é difícil a discriminação entre irregularidades corticais e erosões; não é possível visualizar a inflamação do osso (edema medular ósseo). A ecografia é também altamente dependente do operador e é demorada. Assim sendo, são necessárias mais evidências antes que a ecografia possa ser considerada uma ferramenta útil para prever a progressão radiográfica do dano articular na artrite reumatoide (409).

2.3. Medicina personalizada

A medicina personalizada é outro dos grandes desafios para o futuro próximo na área da artrite reumatoide. Para atingir esse objetivo, são necessárias 2 condições: a) conseguir estimar, adequadamente, a gravidade da doença para assim poder diferenciar os doentes que desenvolvem uma doença grave dos doentes com formas mais ligeiras de doença; e b) conseguir identificar qual é, para o doente individual, a sua capacidade de resposta a um determinado csDMARD ou a um determinado boDMARD específicos (409).

Atualmente, o tratamento da artrite reumatoide é realizado em função da atividade da doença e não é ajustado ao prognóstico individual de cada doente. Consequentemente, alguns doentes com artrite reumatoide recebem um tratamento inadequado, particularmente se a doença for mais grave. Estes factos realçam a necessidade de termos melhores instrumentos de previsão de doença potencialmente mais grave/desfavorável. Apesar de vários modelos preditivos ou matrizes de risco terem sido desenvolvidos, nenhum deles foi ainda validado e apenas predizem adequadamente o *outcome* em cerca de 50% dos doentes (409). Os modelos existentes para avaliar a gravidade da evolução da artrite reumatoide baseiam-se somente na PCR, no título dos ACPAs, nas erosões basais e no número de articulações tumefactas (409). Por outro lado, verificamos que a grande maioria dos biomarcadores de progressão na artrite reumatoide já identificados (409) não foram ainda integrados em modelos de predição. Portanto, é de esperar que a adição dos biomarcadores genéticos, serológicos e imagiológicos mais recentemente identificados aumentará a capacidade preditiva num futuro próximo.

3. Densidade mineral óssea na artrite reumatoide

O envolvimento ósseo na artrite reumatoide representa uma das suas principais complicações, abrangendo três aspetos distintos em termos de alterações remodelação óssea: destruição óssea (com o aparecimento das erosões ósseas), perda óssea peri-articular localizada (manifestando-se como uma osteopenia peri-articular, avaliável por DXA nas mãos, por exemplo) e perda óssea generalizada do esqueleto (quer do esqueleto axial, quer do apendicular, conduzindo a uma osteopenia/osteoporose sistémica).

No terceiro trabalho incluído nesta tese explorámos as associações dos 3 SNPs do LRP5, avaliados quanto ao efeito no dano articular radiográfico, com a DMO em várias localizações anatómicas. Na nossa amostra de doentes portugueses com artrite reumatoide, a frequência genotípica do SNP V667M do LRP5 (88,5% GG, 11,1% AG e 0,005% AA) foi semelhante à relatada anteriormente numa população caucasiana masculina (261). Relativamente ao SNP N740N do LRP5, a frequência do alelo *minor* (alelo T 17, 8%) foi semelhante à reportada previamente noutra população caucasiana (478). Da mesma forma, a frequência genotípica do polimorfismo

A1330V do LRP5 (72,1% CC, 24,5% TC e 3,4% TT) também foi similar à descrita anteriormente numa população caucasiana (479).

Numa meta-análise robusta de vários estudos (480), concluiu-se que os SNPs A1330V e V667M do LRP5 se relacionavam com a DMO da coluna lombar e do colo femoral. Os dados agrupados revelaram que o polimorfismo A1330V do gene LRP5 se associava à DMO na coluna lombar e no colo femoral na população caucasiana. Relativamente ao polimorfismo V667M LRP5, verificou-se que os caucasianos com genótipo VV exibiam uma DMO significativamente maior do que aqueles com os genótipos VM/MM na coluna lombar (em ambos os géneros) e no colo femoral (exclusivamente em mulheres), não se observando quaisquer associações com a DMO total da anca (480). Pelo contrário, na nossa amostra de doentes com artrite reumatoide, os SNPs A1330V e V667M do LRP5 não se relacionaram com a DMO nas diversas localizações do esqueleto, que foram avaliadas por DXA.

Os nossos achados vão de encontro aos de outros dois estudos, que concluíram, após analisar 12 e 23 SNPs do LRP5, respetivamente, e incluindo os SNPs A1330V e V667M, que as variantes genéticas do LRP5 não se associavam à DMO lombar nem à DMO no colo femoral em 1301 mulheres pré-menopáusicas caucasianas e em 964 mulheres espanholas pós-menopáusicas, respetivamente (259, 481). Além disso, o SNP A1330V do LRP5 também não se associou à DMO na população eslovena, nem a uma população masculina sueca (482, 483). Além disso, entre os homens suecos e em doentes japoneses com artrite reumatoide, os genótipos do SNP A1330V do LRP5 também não foram preditores da ocorrência de fraturas auto-relatadas ou do risco de fratura, respetivamente (482, 484). Agueda e colegas, depois de estudar os já mencionados 23 SNPs LRP5 em mulheres espanholas na pós-menopausa, também não conseguiram demonstrar qualquer associação com fraturas osteoporóticas (481).

Além disso, num estudo de associação genética, realizado na população do *Framingham Study Offspring Cohort*, também se concluiu que os SNPs do LRP5 explicam em maior proporção a variabilidade da DMO em homens mais jovens do que em mulheres (478). Em homens com idade igual ou inferior a 60 anos, os SNPs do LRP5 foram significativamente associados à DMO, ou seja, o rs4988321 (V667M) com a DMO do triângulo de Ward no fémur e o rs2306862 (N740N) com a DMO no colo femoral e também no triângulo de Ward do fémur. Estes autores também encontraram uma interação significativa entre a atividade física e esses SNPs [rs2306862 (N740N) e rs3736228 (A1330V)] em termos de DMO da coluna lombar nos homens. Em ambos os polimorfismos, o genótipo TT foi associado a uma DMO mais baixa em homens com valores maiores no *score* de atividade física e, inversamente, a maior DMO em homens com valores menores no *score* de atividade física. Estes factos favorecem a hipótese de que diferenças na força muscular ou na atividade física entre os homens e as mulheres poderão modular a

influência dos polimorfismos do gene LRP5 na massa óssea, explicando as diferenças encontradas e relacionadas com o género. Infelizmente, a dimensão da nossa amostra não foi suficiente para demonstrar a presença de discrepâncias de género nestes SNPs do LRP5 dada a baixa representatividade do género masculino. Além disso, no nosso protocolo de estudo, também não incluímos questionários adequados para avaliar a atividade física nos nossos doentes com artrite reumatoide. Na nossa amostra de doentes reumatoides, embora não encontremos diferenças significativas na DMO entre os 3 possíveis genótipos do SNP N740N do LRP5, quando suprimimos o genótipo TT (raro), a DMO do fémur proximal esquerdo foi significativamente menor em doentes com artrite reumatoide com o genótipo TC *versus* aqueles com o genótipo CC, de acordo com os achados anteriores (478). De facto, na nossa amostra de doentes com artrite reumatoide, o genótipo TC apresentou-se como um significativo preditor negativo da DMO do fémur proximal esquerdo, independentemente do IMC, da idade ao diagnóstico da artrite reumatoide, da duração do tratamento da osteoporose e do HAQ. Curiosamente, no modelo de análise de regressão linear múltipla ajustada, o HAQ, como esperado, também foi um preditor negativo significativo da DMO do fémur proximal esquerdo na nossa amostra e com valores de β (coeficiente) e de p menores que o próprio genótipo TC do SNP N740N do LRP5, reforçando o efeito determinante *major* da inflamação crónica na massa óssea na artrite reumatoide.

Por outro lado, na literatura científica, verifica-se uma escassez de dados no que diz respeito à relação dos SNPs do LRP5 e os biomarcadores de metabolismo ósseo. Um estudo com 570 mulheres caucasianas, pré-menopáusicas e saudáveis, em que foram genotipados os SNPs rs4988321 (A/G) (V667M) e rs3736228 (C/T) (A1330V) do LRP5, mostrou que os genótipos GG e CC exibiam, respetivamente, e para cada SNP, valores séricos mais elevados (ajustados para a idade) de osteocalcina, β -CTX e propeptídeo N-terminal de procólágeno do tipo I (P1NP) (485). Pelo contrário, noutro estudo de associação genética com os mesmos SNPs em mulheres gregas peri e pós-menopáusicas, não foram observados quaisquer efeitos nos níveis séricos de OPG, RANKL e outros marcadores metabólicos do osso (486). Além disso, em mulheres chinesas pós-menopáusicas, o SNP A1330V do LRP5 também não se correlacionou com os marcadores do metabolismo ósseo [níveis séricos de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina, β -CTX e 25 (OH) vitamina D3] (487). Estes achados negativos estão em linha com os nossos, com a exceção de termos observado uma forte associação positiva entre os níveis séricos de esclerostina (um inibidor da via de sinalização Wnt/ β -Catenina canónica) e o genótipo AG do polimorfismo V667M LRP5, cujo significado é desconhecido mas pode estar relacionado com aspetos funcionais desta variante do gene LRP5.

Contudo, o estudo da DMO e do metabolismo ósseo, relacionado com a via de sinalização Wnt/ β -Catenina canónica, na nossa amostra de doentes com artrite reumatoide, não ficou apenas pelo estudo destes 3 SNPs do LRP5. Tal como referimos na Introdução desta dissertação, uma série de evidências indicam a existência de um eixo intestino-osso, previamente desconhecido, e com implicações biológicas significativas (278, 284). Na verdade, parece que parte do efeito regulador da massa óssea do LRP5 advém da modulação dos níveis circulantes da serotonina derivada do intestino (278). Este efeito esquelético indireto do LRP5 (independente da via de sinalização Wnt/ β -Catenina canónica) não exclui a presença dos efeitos diretos dependentes desta via, que estão envolvidos, nomeadamente, na resposta anabólica do osso à sobrecarga mecânica (285) e em algumas mutações do LRP5 que acarretam ganho de função (286).

Por outro lado, em doentes com artrite reumatoide, foram relatados níveis séricos aumentados de serotonina em comparação com indivíduos saudáveis, o que pode contribuir, até certo ponto, para a perda óssea excessiva nesta doença (294, 488). Recentemente, outros investigadores confirmaram estes achados e mostraram ainda que os doentes com espondilite anquilosante apresentavam níveis séricos significativamente mais baixos de serotonina do que os doentes com artrite reumatoide e do que os controlos saudáveis. Em particular, os doentes com espondilite anquilosante sob tratamento com inibidores do TNF α eram os que apresentavam os níveis séricos mais baixos de serotonina (488). Além disso, também demonstraram que estas diferenças nos níveis séricos de serotonina tinham um impacto funcional na via de sinalização da serotonina *ex vivo*. Os níveis séricos de serotonina correlacionaram-se inversamente com a indução do CREB fosforilado em células Saos-2 semelhantes a osteoblastos (488).

Contudo os dados populacionais ainda são escassos, verificando-se a existência de resultados contraditórios, que ficam a dever-se, maioritariamente, a problemas de ordem metodológica, pelo que esta temática foi alvo de estudo no quarto trabalho que compõe esta tese.

Na nossa amostra de doentes com artrite reumatoide, os níveis séricos de serotonina (média \pm DP: 179,3 \pm 108,5 ng/mL), em comparação com os níveis séricos de serotonina num estudo recente, revelaram-se semelhantes aos dos indivíduos saudáveis (média \pm DP: 177,4 \pm 24,58 ng/mL) e menores que o dos doentes com artrite reumatoide (média \pm DP: 244,8 \pm 37,5 ng/mL) nesse mesmo estudo (488). No entanto, existem algumas diferenças metodológicas entre os dois estudos; nomeadamente o controlo dietético da ingestão de triptofano (realizado no nosso) e as técnicas utilizadas para doseamento da serotonina (radioimunoensaio *versus* técnica de ELISA no nosso estudo). A situação ideal teria sido a inclusão de um grupo de controlos saudáveis no nosso estudo para corroborar os achados do estudo anterior, que mostrou níveis séricos de serotonina mais elevados nos doentes

reumatoides *versus* os indivíduos saudáveis – o que constitui uma fraqueza do nosso estudo. Além disso, durante a própria colheita do soro, a serotonina armazenada em plaquetas é libertada e, conseqüentemente, os níveis séricos de serotonina são aproximadamente 100 vezes superiores àqueles que se determinam no plasma pobre em plaquetas (287, 294, 489). Assim, é possível que as associações fracas que nós observámos pudessem ter sido diferentes se tivéssemos utilizado o plasma pobre em plaquetas em vez do soro nos nossos doseamentos de serotonina. Além disso, a serotonina pode ser libertada a partir de plaquetas nas amostras de sangue, particularmente, quando a concentração de anticoagulante é inadequada (490, 491). Num pequeno estudo anterior, a concentração ideal recomendada de EDTA2K era de 7,4-9,9 mmol/L (490, 491); contudo, nós não avaliamos a concentração de EDTA2K nas nossas amostras. Assim, no nosso estudo, demonstrámos uma associação inversa entre os níveis séricos de serotonina e a DMO do fémur proximal total em mulheres pós-menopáusicas com artrite reumatoide. Esta associação foi independente do IMC, da duração da doença e dos anos de menopausa. Na mesma população reumatoide, esta associação não se verificou para os homens, nem para as mulheres pré-menopáusicas, e os níveis séricos de serotonina não se revelaram preditores significativos da DMO da coluna lombar, da mão esquerda, nem da segunda falange proximal da mão esquerda. Os níveis séricos de serotonina também se correlacionaram negativamente com a DMO do fémur proximal no subgrupo de mulheres com artrite reumatoide não tratadas com bisfosfonatos. No entanto, nos doentes com artrite reumatoide não tratados com agentes biotecnológicos, nem com bisfosfonatos, os níveis séricos de serotonina também se correlacionaram negativamente com a DMO da coluna lombar. Os nossos resultados estão de acordo com os de outros autores (279, 287), que encontraram associações negativas entre os níveis séricos de serotonina e a DMO total do colo do fémur, a DMO volumétrica trabecular e a espessura trabecular em 275 mulheres. Além disso, eles também encontraram uma associação inversa com a DMO volumétrica trabecular do colo do fémur no subgrupo das mulheres pré-menopáusicas ($n=185$) (279, 287), embora estas associações tenham sido estatisticamente inferiores às nossas.

Curiosamente, no nosso estudo e apenas nos homens com artrite reumatoide, os níveis séricos de serotonina associaram-se positivamente com o β -CTX e negativamente com a esclerostina, independentemente de se encontrarem medicados com bifosfonatos e agentes biotecnológicos ou com bisfosfonatos, respetivamente. Os níveis séricos de DKK-1 e os de serotonina também se associaram positivamente nos homens com artrite reumatoide não tratados com bisfosfonatos. Entre as mulheres com artrite reumatoide naïves para agentes biotecnológicos, verificou-se uma associação inversa entre os níveis séricos de serotonina e os de OPG. Note-se que associações positivas entre a serotonina sérica e PINP sérico, bem como entre a serotonina

sérica e os níveis séricos de CTX e osteocalcina, já foram também relatadas em diferentes subgrupos (287, 289, 492). Portanto, os nossos achados refletem um nível de complexidade superior no que diz respeito aos efeitos da serotonina no metabolismo ósseo em seres humanos, para além da formação óssea.

CONCLUSÃO

Na artrite reumatoide, os danos cardiovascular e ósseo são importantes fontes de morbidade, incapacidade e mortalidade. Além disso, existe uma evidência crescente duma ligação epidemiológica e fisiopatológica entre a osteoporose e a aterosclerose. Nesta tese acrescentamos conhecimento neste domínio pois encontrámos evidências do papel de elementos da via wnt/LRP5/ β -catenina nestes dois processos patológicos.

As doenças cardiovasculares são uma das principais causas de morte em doentes com artrite reumatoide e a avaliação do risco cardiovascular nestes doentes encontra-se ainda numa fase embrionária na medida em que a maioria das recomendações das sociedades científicas são baseadas nas opiniões de peritos como fonte de evidência. Nesta tese, fornecemos evidências pioneiras nesta área ao encontrarmos uma prevalência de isquemia miocárdica silenciosa em doentes com artrite reumatoide estabelecida, assintomáticos para doença cardiovascular, de 25%, traduzindo assim uma disfunção cardiovascular subclínica. Além disso, o facto de termos demonstrado que estas alterações se associam a níveis séricos elevados de BNP, da razão OPG/RANKL e do DKK-1 (um inibidor da via wnt/LRP5/ β -catenina), leva-nos a defender a necessidade de estudos futuros para definir a utilidade destes doseamentos séricos e da própria cintigrafia de perfusão miocárdica como instrumentos de rastreio na avaliação do risco cardiovascular em doentes com artrite reumatoide. Ainda, dentro do mesmo grupo de população reumatoide, documentámos a presença de cálcio nas artérias coronárias em 53% dos doentes, o que se associou significativamente aos níveis séricos de ApoA1, da razão ApoB/ApoA1, da PCR e do DKK-1, assim como ao uso de estatinas, ao DAS (4v) e ao DAS (4v, PCR). Assim, o nosso trabalho mostrou que, na artrite reumatoide, o *score* de cálcio coronário pode ser uma ferramenta útil na avaliação do risco cardiovascular, sendo particularmente valioso em doentes com a doença inflamatória crónica pior controlada e com um perfil específico de lipoproteínas. De acordo com os nossos dados e reproduzindo os achados dum grupo sueco, poderíamos também sugerir, para além do doseamento das frações lipídicas usuais, o recurso à quantificação dos níveis séricos de ApoB, de ApoA1 e da sua razão na avaliação de rotina do risco cardiovascular em doentes com artrite reumatoide.

Por outro lado, a artrite reumatoide é o protótipo de artrite inflamatória, que afeta, simultaneamente, o osso articular e o osso periarticular, bem como os ossos do esqueleto axial e apendicular, causando aqui osteopenia/osteoporose. A artrite reumatoide também se caracteriza por um aumento da reabsorção óssea, centrada na função osteoclástica e extensivamente estudada, e uma inibição da formação óssea, centrada na função osteoblástica e menos investigada. Nesta doença, as erosões ósseas são típicas e não sofrem reparação. Além disso, sabe-se que a função osteoblástica é regulada pela via *wnt*/LRP5/ β -catenina canónica e que a destruição articular na artrite reumatoide e a DMO são parcialmente herdadas. Na nossa população de doentes com artrite reumatoide, encontramos associações significativas entre três SNPs do LRP5 (p.A1330V, p.N740N e p.V667M), previamente relacionados com a variabilidade da DMO na população geral, e a gravidade do dano radiográfico, reforçando as evidências de hereditariedade da destruição óssea na artrite reumatoide. Assim, com este trabalho replicámos a evidência do LRP5 como biomarcador genético para a gravidade da destruição articular radiográfica na artrite reumatoide, conforme tinha sido relatado anteriormente numa coorte de Leiden, e demonstrámos também, na população reumatoide, uma associação do SNP p.N740N do LRP5 à DMO femoral. No futuro, será deveras importante confirmar o papel preditor destas e de outras variantes polimórficas do gene do LRP5, entretanto descritas, da gravidade do dano radiográfico noutras populações de doentes com artrite reumatoide.

Além disso, na literatura, estudos recentes demonstraram que a serotonina circulante tem um papel regulador da osteoblastogénese, relacionando-se com a via *wnt*/LRP5/ β -catenina. Em doentes com artrite reumatoide têm sido também reportados níveis elevados de serotonina *versus* controlos. Contudo, persistem ainda inúmeras controvérsias acerca deste eixo intestino-osso, quer em modelos animais quer no Homem. Este trabalho trouxe nova informação neste domínio, reforçando o papel da serotonina circulante como regulador da massa óssea já que os seus níveis séricos se revelaram preditores negativos da DMO femoral em mulheres pós-menopáusicas com artrite reumatoide. Curiosamente, os nossos achados em termos de biomarcadores ósseos levaram-nos a questionar a suposta influência exclusiva da serotonina na inibição da formação óssea.

Uma redução mais efetiva da morbimortalidade da artrite reumatoide exige a compreensão dos mecanismos envolvidos nas diferentes manifestações do dano multissistémico. Neste trabalho foram exploradas associações de mediadores da via *wnt*/LRP5/ β -catenina com a doença cardiovascular e a doença óssea, o impacto de fatores genéticos desta via na gravidade do dano articular e a importância da serotonina circulante no osso. As implicações futuras de alguns dos

resultados obtidos dependerão da sua replicação noutras séries de doentes ou de resultados de estudos de intervenção farmacológica com impacto nesta mesma via de sinalização.

BIBLIOGRAFIA

1. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2016;388(10055):2023-38.
2. Hoy DG, Smith E, Cross M, Sanchez-Riera L, Buchbinder R, Blyth FM, et al. The global burden of musculoskeletal conditions for 2010: an overview of methods. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(6):982-9.
3. Kitas GD, Gabriel SE. Cardiovascular disease in rheumatoid arthritis: state of the art and future perspectives. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(1):8-14.
4. Sokka T, Kautiainen H, Pincus T, Verstappen SM, Aggarwal A, Alten R, et al. Work disability remains a major problem in rheumatoid arthritis in the 2000s: data from 32 countries in the QUEST-RA study. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(2):R42.
5. Silman AJ, Pearson JE. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*. 2002;4 Suppl 3:S265-72.
6. Alamanos Y, Voulgari PV, Drosos AA. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum*. 2006;36(3):182-8.
7. Branco JC, Rodrigues AM, Gouveia N, Eusebio M, Ramiro S, Machado PM, et al. Prevalence of rheumatic and musculoskeletal diseases and their impact on health-related quality of life, physical function and mental health in Portugal: results from EpiReumaPt- a national health survey. *RMD Open*. 2016;2(1):e000166.
8. Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A, et al. Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br J Rheumatol*. 1993;32(10):903-7.
9. Jiang X, Frisell T, Askling J, Karlson EW, Klareskog L, Alfredsson L, et al. To what extent is the familial risk of rheumatoid arthritis explained by established rheumatoid arthritis risk factors? *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(2):352-62.
10. Frisell T, Hellgren K, Alfredsson L, Raychaudhuri S, Klareskog L, Askling J. Familial aggregation of arthritis-related diseases in seropositive and seronegative rheumatoid arthritis: a register-based case-control study in Sweden. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(1):183-9.
11. Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, et al. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature*. 2014;506(7488):376-81.
12. Viatte S, Plant D, Han B, Fu B, Yarwood A, Thomson W, et al. Association of HLA-DRB1 haplotypes with rheumatoid arthritis severity, mortality, and treatment response. *JAMA*. 2015;313(16):1645-56.
13. Barra L, Pope J, Bessette L, Haraoui B, Bykerk V. Lack of seroconversion of rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide in patients with early inflammatory arthritis: a systematic literature review. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50(2):311-6.
14. Nell-Duxneuner V, Machold K, Stamm T, Eberl G, Heinzl H, Hoefler E, et al. Autoantibody profiling in patients with very early rheumatoid arthritis: a follow-up study. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(1):169-74.
15. Liu Y, Aryee MJ, Padyukov L, Fallin MD, Hesselberg E, Runarsson A, et al. Epigenome-wide association data implicate DNA methylation as an intermediary of genetic risk in rheumatoid arthritis. *Nat Biotechnol*. 2013;31(2):142-7.
16. Klein K, Gay S. Epigenetics in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2015;27(1):76-82.
17. Bluml S, Bonelli M, Niederreiter B, Puchner A, Mayr G, Hayer S, et al. Essential role of microRNA-155 in the pathogenesis of autoimmune arthritis in mice. *Arthritis Rheum*. 2011;63(5):1281-8.
18. Silman AJ, Newman J, MacGregor AJ. Cigarette smoking increases the risk of rheumatoid arthritis. Results from a nationwide study of disease-discordant twins. *Arthritis Rheum*. 1996;39(5):732-5.

19. Klareskog L, Malmstrom V, Lundberg K, Padyukov L, Alfredsson L. Smoking, citrullination and genetic variability in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Semin Immunol.* 2011;23(2):92-8.
20. Millar K, Lloyd SM, McLean JS, Batty GD, Burns H, Cavanagh J, et al. Personality, socio-economic status and inflammation: cross-sectional, population-based study. *PLoS One.* 2013;8(3):e58256.
21. Wegner N, Wait R, Sroka A, Eick S, Nguyen KA, Lundberg K, et al. Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and alpha-enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2010;62(9):2662-72.
22. Scher JU, Littman DR, Abramson SB. Microbiome in Inflammatory Arthritis and Human Rheumatic Diseases. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(1):35-45.
23. Scher JU, Ubeda C, Artacho A, Attur M, Isaac S, Reddy SM, et al. Decreased bacterial diversity characterizes the altered gut microbiota in patients with psoriatic arthritis, resembling dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(1):128-39.
24. van Gaalen FA, van Aken J, Huizinga TW, Schreuder GM, Breedveld FC, Zanelli E, et al. Association between HLA class II genes and autoantibodies to cyclic citrullinated peptides (CCPs) influences the severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50(7):2113-21.
25. Anquetil F, Clavel C, Offer G, Serre G, Sebbag M. IgM and IgA rheumatoid factors purified from rheumatoid arthritis sera boost the Fc receptor- and complement-dependent effector functions of the disease-specific anti-citrullinated protein autoantibodies. *J Immunol.* 2015;194(8):3664-74.
26. Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest.* 1998;101(1):273-81.
27. Girbal-Neuhausser E, Durieux JJ, Arnaud M, Dalbon P, Sebbag M, Vincent C, et al. The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues. *J Immunol.* 1999;162(1):585-94.
28. Reynisdottir G, Olsen H, Joshua V, Engstrom M, Forsslund H, Karimi R, et al. Signs of immune activation and local inflammation are present in the bronchial tissue of patients with untreated early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(9):1722-7.
29. Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum.* 2004;50(2):380-6.
30. Rombouts Y, Willemze A, van Beers JJ, Shi J, Kerkman PF, van Toorn L, et al. Extensive glycosylation of ACPA-IgG variable domains modulates binding to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(3):578-85.
31. Rombouts Y, Ewing E, van de Stadt LA, Selman MH, Trouw LA, Deelder AM, et al. Anti-citrullinated protein antibodies acquire a pro-inflammatory Fc glycosylation phenotype prior to the onset of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(1):234-41.
32. Kerkman PF, Fabre E, van der Voort EI, Zaldumbide A, Rombouts Y, Rispens T, et al. Identification and characterisation of citrullinated antigen-specific B cells in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(6):1170-6.
33. Harre U, Georgess D, Bang H, Bozec A, Axmann R, Ossipova E, et al. Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J Clin Invest.* 2012;122(5):1791-802.
34. Bohler C, Radner H, Smolen JS, Aletaha D. Serological changes in the course of traditional and biological disease modifying therapy of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(2):241-4.

35. Shi J, van Veelen PA, Mahler M, Janssen GM, Drijfhout JW, Huizinga TW, et al. Carbamylation and antibodies against carbamylated proteins in autoimmunity and other pathologies. *Autoimmun Rev.* 2014;13(3):225-30.
36. Sokolove J, Johnson DS, Lahey LJ, Wagner CA, Cheng D, Thiele GM, et al. Rheumatoid factor as a potentiator of anti-citrullinated protein antibody-mediated inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(4):813-21.
37. Klarenbeek PL, de Hair MJ, Doorenspleet ME, van Schaik BD, Esveltdt RE, van de Sande MG, et al. Inflamed target tissue provides a specific niche for highly expanded T-cell clones in early human autoimmune disease. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(6):1088-93.
38. James EA, Rieck M, Pieper J, Gebe JA, Yue BB, Tatum M, et al. Citrulline-specific Th1 cells are increased in rheumatoid arthritis and their frequency is influenced by disease duration and therapy. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(7):1712-22.
39. de Hair MJ, Zijlstra IA, Boumans MJ, van de Sande MG, Maas M, Gerlag DM, et al. Hunting for the pathogenesis of rheumatoid arthritis: core-needle biopsy of inguinal lymph nodes as a new research tool. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(11):1911-2.
40. Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2007;370(9602):1861-74.
41. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2011;365(23):2205-19.
42. Humby F, Kelly S, Hands R, Rocher V, DiCicco M, Ng N, et al. Use of ultrasound-guided small joint biopsy to evaluate the histopathologic response to rheumatoid arthritis therapy: recommendations for application to clinical trials. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(10):2601-10.
43. Feldmann M, Maini SR. Role of cytokines in rheumatoid arthritis: an education in pathophysiology and therapeutics. *Immunol Rev.* 2008;223:7-19.
44. Redlich K, Hayer S, Ricci R, David JP, Tohidast-Akrad M, Kollias G, et al. Osteoclasts are essential for TNF-alpha-mediated joint destruction. *J Clin Invest.* 2002;110(10):1419-27.
45. Martel-Pelletier J, Welsch DJ, Pelletier JP. Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2001;15(5):805-29.
46. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(9):1580-8.
47. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988;31(3):315-24.
48. Radner H, Neogi T, Smolen JS, Aletaha D. Performance of the 2010 ACR/EULAR classification criteria for rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(1):114-23.
49. Hurd ER. Extraarticular manifestations of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum.* 1979;8(3):151-76.
50. van der Heijde DM, van't Hof MA, van Riel PL, van Leeuwen MA, van Rijswijk MH, van de Putte LB. Validity of single variables and composite indices for measuring disease activity in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1992;51(2):177-81.
51. Welsing PM, van Gestel AM, Swinkels HL, Kiemeneij LA, van Riel PL. The relationship between disease activity, joint destruction, and functional capacity over the course of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2001;44(9):2009-17.
52. Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995;38(1):44-8.
53. Smolen JS, Breedveld FC, Schiff MH, Kalden JR, Emery P, Eberl G, et al. A simplified disease activity index for rheumatoid arthritis for use in clinical practice. *Rheumatology (Oxford).* 2003;42(2):244-57.

54. Aletaha D, Nell VP, Stamm T, Uffmann M, Pflugbeil S, Machold K, et al. Acute phase reactants add little to composite disease activity indices for rheumatoid arthritis: validation of a clinical activity score. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(4):R796-806.
55. Aletaha D, Martinez-Avila J, Kvien TK, Smolen JS. Definition of treatment response in rheumatoid arthritis based on the simplified and the clinical disease activity index. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(7):1190-6.
56. Radner H, Smolen JS, Aletaha D. Remission in rheumatoid arthritis: benefit over low disease activity in patient-reported outcomes and costs. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(1):R56.
57. Smolen JS, Han C, van der Heijde DM, Emery P, Bathon JM, Keystone E, et al. Radiographic changes in rheumatoid arthritis patients attaining different disease activity states with methotrexate monotherapy and infliximab plus methotrexate: the impacts of remission and tumour necrosis factor blockade. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(6):823-7.
58. Welsing PM, Landewe RB, van Riel PL, Boers M, van Gestel AM, van der Linden S, et al. The relationship between disease activity and radiologic progression in patients with rheumatoid arthritis: a longitudinal analysis. *Arthritis Rheum*. 2004;50(7):2082-93.
59. Smolen JS, Landewe R, Breedveld FC, Buch M, Burmester G, Dougados M, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(3):492-509.
60. Singh JA, Saag KG, Bridges SL, Jr., Akl EA, Bannuru RR, Sullivan MC, et al. 2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2016;68(1):1-25.
61. Felson DT, Smolen JS, Wells G, Zhang B, van Tuyl LH, Funovits J, et al. American College of Rheumatology/European League against Rheumatism provisional definition of remission in rheumatoid arthritis for clinical trials. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(3):404-13.
62. Kavanaugh A, Fleischmann RM, Emery P, Kupper H, Redden L, Guertel B, et al. Clinical, functional and radiographic consequences of achieving stable low disease activity and remission with adalimumab plus methotrexate or methotrexate alone in early rheumatoid arthritis: 26-week results from the randomised, controlled OPTIMA study. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(1):64-71.
63. Thiele K, Huscher D, Bischoff S, Spathling-Mestekemper S, Backhaus M, Aringer M, et al. Performance of the 2011 ACR/EULAR preliminary remission criteria compared with DAS28 remission in unselected patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(7):1194-9.
64. Makinen H, Kautiainen H, Hannonen P, Sokka T. Is DAS28 an appropriate tool to assess remission in rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis*. 2005;64(10):1410-3.
65. Fleischmann R, van der Heijde D, Koenig AS, Pedersen R, Szumski A, Marshall L, et al. How much does Disease Activity Score in 28 joints ESR and CRP calculations underestimate disease activity compared with the Simplified Disease Activity Index? *Ann Rheum Dis*. 2015;74(6):1132-7.
66. Balsa A, de Miguel E, Castillo C, Peiteado D, Martin-Mola E. Superiority of SDAI over DAS-28 in assessment of remission in rheumatoid arthritis patients using power Doppler ultrasonography as a gold standard. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49(4):683-90.
67. Smolen JS, Collaud Basset S, Boers M, Breedveld F, Edwards CJ, Kvien TK, et al. Clinical trials of new drugs for the treatment of rheumatoid arthritis: focus on early disease. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(7):1268-71.
68. Smolen JS, Aletaha D. Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab and attainment of disease remission in rheumatoid arthritis: the role of acute-phase reactants. *Arthritis Rheum*. 2011;63(1):43-52.
69. Fleischmann R, Kremer J, Cush J, Schulze-Koops H, Connell CA, Bradley JD, et al. Placebo-controlled trial of tofacitinib monotherapy in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2012;367(6):495-507.

70. Smolen JS, Breedveld FC, Burmester GR, Bykerk V, Dougados M, Emery P, et al. Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(1):3-15.
71. van der Heijde D, Simon L, Smolen J, Strand V, Sharp J, Boers M, et al. How to report radiographic data in randomized clinical trials in rheumatoid arthritis: guidelines from a roundtable discussion. *Arthritis Rheum*. 2002;47(2):215-8.
72. Jimenez-Boj E, Nobauer-Huhmann I, Hanslik-Schnabel B, Dorotka R, Wanivenhaus AH, Kainberger F, et al. Bone erosions and bone marrow edema as defined by magnetic resonance imaging reflect true bone marrow inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007;56(4):1118-24.
73. Mandl P, Balint PV, Brault Y, Backhaus M, D'Agostino MA, Grassi W, et al. Metrologic properties of ultrasound versus clinical evaluation of synovitis in rheumatoid arthritis: results of a multicenter, randomized study. *Arthritis Rheum*. 2012;64(4):1272-82.
74. Sakellariou G, Scire CA, Verstappen SM, Montecucco C, Caporali R. In patients with early rheumatoid arthritis, the new ACR/EULAR definition of remission identifies patients with persistent absence of functional disability and suppression of ultrasonographic synovitis. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(2):245-9.
75. Dale J, Stirling A, Zhang R, Purves D, Foley J, Sambrook M, et al. Targeting ultrasound remission in early rheumatoid arthritis: the results of the TaSER study, a randomised clinical trial. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(6):1043-50.
76. Terslev L, Torp-Pedersen S, Qvistgaard E, von der Recke P, Bliddal H. Doppler ultrasound findings in healthy wrists and finger joints. *Ann Rheum Dis*. 2004;63(6):644-8.
77. Fries JF, Spitz P, Kraines RG, Holman HR. Measurement of patient outcome in arthritis. *Arthritis Rheum*. 1980;23(2):137-45.
78. Combe B, Landewe R, Lukas C, Bolosiu HD, Breedveld F, Dougados M, et al. EULAR recommendations for the management of early arthritis: report of a task force of the European Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT). *Ann Rheum Dis*. 2007;66(1):34-45.
79. Grigor C, Capell H, Stirling A, McMahon AD, Lock P, Vallance R, et al. Effect of a treatment strategy of tight control for rheumatoid arthritis (the TICORA study): a single-blind randomised controlled trial. *Lancet*. 2004;364(9430):263-9.
80. Gullick NJ, Oakley SP, Zain A, Gibson T, Jones T, Mistlin A, et al. Goal-directed therapy for RA in routine practice is associated with improved function in patients with disease duration up to 15 years. *Rheumatology (Oxford)*. 2012;51(4):759-61.
81. Wassenberg S, Rau R, Steinfeld P, Zeidler H. Very low-dose prednisolone in early rheumatoid arthritis retards radiographic progression over two years: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*. 2005;52(11):3371-80.
82. Smolen JS, Emery P, Fleischmann R, van Vollenhoven RF, Pavelka K, Durez P, et al. Adjustment of therapy in rheumatoid arthritis on the basis of achievement of stable low disease activity with adalimumab plus methotrexate or methotrexate alone: the randomised controlled OPTIMA trial. *Lancet*. 2014;383(9914):321-32.
83. Meune C, Touze E, Trinquart L, Allanore Y. High risk of clinical cardiovascular events in rheumatoid arthritis: Levels of associations of myocardial infarction and stroke through a systematic review and meta-analysis. *Arch Cardiovasc Dis*. 2010;103(4):253-61.
84. Peters MJ, van Halm VP, Voskuyl AE, Smulders YM, Boers M, Lems WF, et al. Does rheumatoid arthritis equal diabetes mellitus as an independent risk factor for cardiovascular disease? A prospective study. *Arthritis Rheum*. 2009;61(11):1571-9.
85. Peters MJ, Symmons DP, McCarey D, Dijkmans BA, Nicola P, Kvien TK, et al. EULAR evidence-based recommendations for cardiovascular risk management in patients with rheumatoid arthritis and other forms of inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(2):325-31.

86. Chuang YW, Yu MC, Lin CL, Yu TM, Shu KH, Huang ST, et al. Risk of peripheral arterial occlusive disease in patients with rheumatoid arthritis. A nationwide population-based cohort study. *Thromb Haemost*. 2016;115(2):439-45.
87. Van Doornum S, Bohensky M, Tacey MA, Brand CA, Sundararajan V, Wicks IP. Increased 30-day and 1-year mortality rates and lower coronary revascularisation rates following acute myocardial infarction in patients with autoimmune rheumatic disease. *Arthritis Res Ther*. 2015;17:38.
88. Humphreys JH, Warner A, Chipping J, Marshall T, Lunt M, Symmons DP, et al. Mortality trends in patients with early rheumatoid arthritis over 20 years: results from the Norfolk Arthritis Register. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2014;66(9):1296-301.
89. Meek IL, Vonkeman HE, van de Laar MA. Cardiovascular case fatality in rheumatoid arthritis is decreasing; first prospective analysis of a current low disease activity rheumatoid arthritis cohort and review of the literature. *BMC Musculoskelet Disord*. 2014;15:142.
90. Agca R, Heslinga SC, Rollefstad S, Heslinga M, McInnes IB, Peters MJ, et al. EULAR recommendations for cardiovascular disease risk management in patients with rheumatoid arthritis and other forms of inflammatory joint disorders: 2015/2016 update. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(1):17-28.
91. Emerging Risk Factors C, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Pennells L, Wood AM, White IR, et al. C-reactive protein, fibrinogen, and cardiovascular disease prediction. *N Engl J Med*. 2012;367(14):1310-20.
92. Solomon DH, Greenberg J, Curtis JR, Liu M, Farkouh ME, Tsao P, et al. Derivation and internal validation of an expanded cardiovascular risk prediction score for rheumatoid arthritis: a Consortium of Rheumatology Researchers of North America Registry Study. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(8):1995-2003.
93. Baghdadi LR, Woodman RJ, Shanahan EM, Mangoni AA. The impact of traditional cardiovascular risk factors on cardiovascular outcomes in patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2015;10(2):e0117952.
94. da Cunha VR, Brenol CV, Brenol JC, Fuchs SC, Arlindo EM, Melo IM, et al. Metabolic syndrome prevalence is increased in rheumatoid arthritis patients and is associated with disease activity. *Scand J Rheumatol*. 2012;41(3):186-91.
95. Kerekes G, Nurmohamed MT, Gonzalez-Gay MA, Seres I, Paragh G, Kardos Z, et al. Rheumatoid arthritis and metabolic syndrome. *Nat Rev Rheumatol*. 2014;10(11):691-6.
96. Ferraz-Amaro I, Gonzalez-Juanatey C, Lopez-Mejias R, Riancho-Zarrabeitia L, Gonzalez-Gay MA. Metabolic syndrome in rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:710928.
97. Eren E, Yilmaz N, Aydin O. High Density Lipoprotein and it's Dysfunction. *Open Biochem J*. 2012;6:78-93.
98. Tanimoto N, Kumon Y, Suehiro T, Ohkubo S, Ikeda Y, Nishiya K, et al. Serum paraoxonase activity decreases in rheumatoid arthritis. *Life Sci*. 2003;72(25):2877-85.
99. Meek IL, Vonkeman HE, van de Laar MA. Hyperuricaemia: a marker of increased cardiovascular risk in rheumatic patients: analysis of the ACT-CVD cohort. *BMC Musculoskelet Disord*. 2014;15:174.
100. Summers GD, Metsios GS, Stavropoulos-Kalinoglou A, Kitas GD. Rheumatoid cachexia and cardiovascular disease. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6(8):445-51.
101. Escalante A, Haas RW, del Rincon I. Paradoxical effect of body mass index on survival in rheumatoid arthritis: role of comorbidity and systemic inflammation. *Arch Intern Med*. 2005;165(14):1624-9.
102. Wesley A, Bengtsson C, Elkan AC, Klareskog L, Alfredsson L, Wedren S, et al. Association between body mass index and anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis: results from a population-based case-control study. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2013;65(1):107-12.

103. Giles JT, Allison M, Blumenthal RS, Post W, Gelber AC, Petri M, et al. Abdominal adiposity in rheumatoid arthritis: association with cardiometabolic risk factors and disease characteristics. *Arthritis Rheum.* 2010;62(11):3173-82.
104. Rall LC, Roubenoff R. Rheumatoid cachexia: metabolic abnormalities, mechanisms and interventions. *Rheumatology (Oxford).* 2004;43(10):1219-23.
105. Robertson J, Peters MJ, McInnes IB, Sattar N. Changes in lipid levels with inflammation and therapy in RA: a maturing paradigm. *Nat Rev Rheumatol.* 2013;9(9):513-23.
106. Myasoedova E, Crowson CS, Kremers HM, Roger VL, Fitz-Gibbon PD, Therneau TM, et al. Lipid paradox in rheumatoid arthritis: the impact of serum lipid measures and systemic inflammation on the risk of cardiovascular disease. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(3):482-7.
107. Hurt-Camejo E, Paredes S, Masana L, Camejo G, Sartipy P, Rosengren B, et al. Elevated levels of small, low-density lipoprotein with high affinity for arterial matrix components in patients with rheumatoid arthritis: possible contribution of phospholipase A2 to this atherogenic profile. *Arthritis Rheum.* 2001;44(12):2761-7.
108. Rizzo M, Spinaz GA, Cesur M, Ozbalkan Z, Rini GB, Berneis K. Atherogenic lipoprotein phenotype and LDL size and subclasses in drug-naïve patients with early rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis.* 2009;207(2):502-6.
109. Hahn BH, Grossman J, Chen W, McMahon M. The pathogenesis of atherosclerosis in autoimmune rheumatic diseases: roles of inflammation and dyslipidemia. *J Autoimmun.* 2007;28(2-3):69-75.
110. Montecucco F, Mach F. Common inflammatory mediators orchestrate pathophysiological processes in rheumatoid arthritis and atherosclerosis. *Rheumatology (Oxford).* 2009;48(1):11-22.
111. Wang J, Hu B, Kong L, Cai H, Zhang C. Native, oxidized lipoprotein(a) and lipoprotein(a) immune complex in patients with active and inactive rheumatoid arthritis: plasma concentrations and relationship to inflammation. *Clin Chim Acta.* 2008;390(1-2):67-71.
112. Ronda N, Favari E, Borghi MO, Ingegnoli F, Gerosa M, Chighizola C, et al. Impaired serum cholesterol efflux capacity in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(3):609-15.
113. McInnes IB, Schett G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2017;389(10086):2328-37.
114. McInnes IB, Thompson L, Giles JT, Bathon JM, Salmon JE, Beaulieu AD, et al. Effect of interleukin-6 receptor blockade on surrogates of vascular risk in rheumatoid arthritis: MEASURE, a randomised, placebo-controlled study. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(4):694-702.
115. Gabay C, McInnes IB, Kavanaugh A, Tuckwell K, Klearman M, Pulley J, et al. Comparison of lipid and lipid-associated cardiovascular risk marker changes after treatment with tocilizumab or adalimumab in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(10):1806-12.
116. Charles-Schoeman C, Fleischmann R, Davignon J, Schwartz H, Turner SM, Beysen C, et al. Potential mechanisms leading to the abnormal lipid profile in patients with rheumatoid arthritis versus healthy volunteers and reversal by tofacitinib. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(3):616-25.
117. Micha R, Imamura F, Wyler von Ballmoos M, Solomon DH, Hernan MA, Ridker PM, et al. Systematic review and meta-analysis of methotrexate use and risk of cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2011;108(9):1362-70.
118. Carmona L, Descalzo MA, Perez-Pampin E, Ruiz-Montesinos D, Erra A, Cobo T, et al. All-cause and cause-specific mortality in rheumatoid arthritis are not greater than expected when treated with tumour necrosis factor antagonists. *Ann Rheum Dis.* 2007;66(7):880-5.
119. Greenberg JD, Kremer JM, Curtis JR, Hochberg MC, Reed G, Tsao P, et al. Tumour necrosis factor antagonist use and associated risk reduction of cardiovascular events among patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(4):576-82.

120. Szekanecz Z, Kerekes G, Vegh E, Kardos Z, Barath Z, Tamasi L, et al. Autoimmune atherosclerosis in 3D: How it develops, how to diagnose and what to do. *Autoimmun Rev.* 2016;15(7):756-69.
121. Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Pineiro A, Garcia-Porrúa C, Testa A, Llorca J. High-grade C-reactive protein elevation correlates with accelerated atherogenesis in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2005;32(7):1219-23.
122. Book C, Saxne T, Jacobsson LT. Prediction of mortality in rheumatoid arthritis based on disease activity markers. *J Rheumatol.* 2005;32(3):430-4.
123. Kerekes G, Szekanecz Z, Der H, Sandor Z, Lakos G, Muszbek L, et al. Endothelial dysfunction and atherosclerosis in rheumatoid arthritis: a multiparametric analysis using imaging techniques and laboratory markers of inflammation and autoimmunity. *J Rheumatol.* 2008;35(3):398-406.
124. Ajeganova S, Humphreys JH, Verheul MK, van Steenberg HW, van Nies JA, Hafstrom I, et al. Anticitrullinated protein antibodies and rheumatoid factor are associated with increased mortality but with different causes of death in patients with rheumatoid arthritis: a longitudinal study in three European cohorts. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(11):1924-32.
125. Mackey RH, Kuller LH, Deane KD, Walitt BT, Chang YF, Holers VM, et al. Rheumatoid Arthritis, Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Positivity, and Cardiovascular Disease Risk in the Women's Health Initiative. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(9):2311-22.
126. Laczik R, Szodoray P, Veres K, Szomjak E, Csipo I, Sipka S, Jr., et al. Assessment of IgG antibodies to oxidized LDL in patients with acute coronary syndrome. *Lupus.* 2011;20(7):730-5.
127. Skeoch S, Bruce IN. Atherosclerosis in rheumatoid arthritis: is it all about inflammation? *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11(7):390-400.
128. Farragher TM, Goodson NJ, Naseem H, Silman AJ, Thomson W, Symmons D, et al. Association of the HLA-DRB1 gene with premature death, particularly from cardiovascular disease, in patients with rheumatoid arthritis and inflammatory polyarthritis. *Arthritis Rheum.* 2008;58(2):359-69.
129. Sherer Y, Shoenfeld Y. Mechanisms of disease: atherosclerosis in autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2006;2(2):99-106.
130. Gonzalez-Gay MA, Garcia-Unzueta MT, De Matias JM, Gonzalez-Juanatey C, Garcia-Porrúa C, Sanchez-Andrade A, et al. Influence of anti-TNF-alpha infliximab therapy on adhesion molecules associated with atherogenesis in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2006;24(4):373-9.
131. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation.* 2000;101(18):2149-53.
132. Martinovic I, Abegunewardene N, Seul M, Vosseler M, Horstick G, Buerke M, et al. Elevated monocyte chemoattractant protein-1 serum levels in patients at risk for coronary artery disease. *Circ J.* 2005;69(12):1484-9.
133. Gomez R, Conde J, Scotece M, Gomez-Reino JJ, Lago F, Gualillo O. What's new in our understanding of the role of adipokines in rheumatic diseases? *Nat Rev Rheumatol.* 2011;7(9):528-36.
134. Lee SE, Kim HS. Human resistin in cardiovascular disease. *J Smooth Muscle Res.* 2012;48(1):27-35.
135. Dessein PH, Norton GR, Badenhorst M, Woodiwiss AJ, Solomon A. Rheumatoid arthritis impacts on the independent relationships between circulating adiponectin concentrations and cardiovascular metabolic risk. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:461849.
136. Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Rodriguez-Rodriguez L, Miranda-Filloo JA, Martin J, Llorca J. Lack of association between adipokines and ghrelin and carotid intima-media thickness in patients with severe rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2011;29(2):358-9.

137. Otero M, Lago R, Gomez R, Dieguez C, Lago F, Gomez-Reino J, et al. Towards a pro-inflammatory and immunomodulatory emerging role of leptin. *Rheumatology (Oxford)*. 2006;45(8):944-50.
138. Rho YH, Solus J, Sokka T, Oeser A, Chung CP, Gebretsadik T, et al. Adipocytokines are associated with radiographic joint damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009;60(7):1906-14.
139. Giles JT. Adipokine mediators of inflammation and cardiometabolic comorbidity in rheumatoid arthritis: is there a master adipokine? *J Rheumatol*. 2014;41(9):1725-7.
140. Montecucco F, Steffens S, Mach F. The immune response is involved in atherosclerotic plaque calcification: could the RANKL/RANK/OPG system be a marker of plaque instability? *Clin Dev Immunol*. 2007;2007:75805.
141. Asanuma Y, Chung CP, Oeser A, Solus JF, Avalos I, Gebretsadik T, et al. Serum osteoprotegerin is increased and independently associated with coronary-artery atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis*. 2007;195(2):e135-41.
142. Arts EE, Popa CD, Den Broeder AA, Donders R, Sandoo A, Toms T, et al. Prediction of cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: performance of original and adapted SCORE algorithms. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(4):674-80.
143. Kerekes G, Soltesz P, Nurmohamed MT, Gonzalez-Gay MA, Turiel M, Vegh E, et al. Validated methods for assessment of subclinical atherosclerosis in rheumatology. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8(4):224-34.
144. Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Vazquez-Rodriguez TR, Diaz-Varela N, Garcia-Quiroga H, Gonzalez-Gay MA. Short-term improvement of endothelial function in rituximab-treated rheumatoid arthritis patients refractory to tumor necrosis factor alpha blocker therapy. *Arthritis Rheum*. 2008;59(12):1821-4.
145. Hansel S, Lassig G, Pistrosch F, Passauer J. Endothelial dysfunction in young patients with long-term rheumatoid arthritis and low disease activity. *Atherosclerosis*. 2003;170(1):177-80.
146. Ambrosino P, Lupoli R, Di Minno A, Tasso M, Peluso R, Di Minno MN. Subclinical atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. A meta-analysis of literature studies. *Thromb Haemost*. 2015;113(5):916-30.
147. Corrales A, Gonzalez-Juanatey C, Peiro ME, Blanco R, Llorca J, Gonzalez-Gay MA. Carotid ultrasound is useful for the cardiovascular risk stratification of patients with rheumatoid arthritis: results of a population-based study. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(4):722-7.
148. Corrales A, Parra JA, Gonzalez-Juanatey C, Rueda-Gotor J, Blanco R, Llorca J, et al. Cardiovascular risk stratification in rheumatic diseases: carotid ultrasound is more sensitive than Coronary Artery Calcification Score to detect subclinical atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(11):1764-70.
149. Ajeganova S, de Faire U, Jogestrand T, Frostegard J, Hafstrom I. Carotid atherosclerosis, disease measures, oxidized low-density lipoproteins, and atheroprotective natural antibodies for cardiovascular disease in early rheumatoid arthritis -- an inception cohort study. *J Rheumatol*. 2012;39(6):1146-54.
150. Souto A, Salgado E, Maneiro JR, Mera A, Carmona L, Gomez-Reino JJ. Lipid profile changes in patients with chronic inflammatory arthritis treated with biologic agents and tofacitinib in randomized clinical trials: a systematic review and meta-analysis. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(1):117-27.
151. del Rincon I, Freeman GL, Haas RW, O'Leary DH, Escalante A. Relative contribution of cardiovascular risk factors and rheumatoid arthritis clinical manifestations to atherosclerosis. *Arthritis Rheum*. 2005;52(11):3413-23.
152. Semb AG, Rollefstad S, Provan SA, Kvien TK, Strandén E, Olsen IC, et al. Carotid plaque characteristics and disease activity in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2013;40(4):359-68.
153. Authors/Task Force M, Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint

- Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts): Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur J Prev Cardiol.* 2016;23(11):NP1-NP96.
154. Soltesz P, Der H, Kerekes G, Szodoray P, Szucs G, Danko K, et al. A comparative study of arterial stiffness, flow-mediated vasodilation of the brachial artery, and the thickness of the carotid artery intima-media in patients with systemic autoimmune diseases. *Clin Rheumatol.* 2009;28(6):655-62.
 155. Karpouzas GA, Malpeso J, Choi TY, Li D, Munoz S, Budoff MJ. Prevalence, extent and composition of coronary plaque in patients with rheumatoid arthritis without symptoms or prior diagnosis of coronary artery disease. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(10):1797-804.
 156. Ohman M, Ohman ML, Wallberg-Jonsson S. The apoB/apoA1 ratio predicts future cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 2014;43(4):259-64.
 157. Mirjafari H, Welsh P, Verstappen SM, Wilson P, Marshall T, Edlin H, et al. N-terminal pro-brain-type natriuretic peptide (NT-pro-BNP) and mortality risk in early inflammatory polyarthritis: results from the Norfolk Arthritis Registry (NOAR). *Ann Rheum Dis.* 2014;73(4):684-90.
 158. Briot K, Geusens P, Em Bultink I, Lems WF, Roux C. Inflammatory diseases and bone fragility. *Osteoporos Int.* 2017;28(12):3301-14.
 159. Baum R, Gravallese EM. Bone as a Target Organ in Rheumatic Disease: Impact on Osteoclasts and Osteoblasts. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2016;51(1):1-15.
 160. Ideguchi H, Ohno S, Hattori H, Senuma A, Ishigatsubo Y. Bone erosions in rheumatoid arthritis can be repaired through reduction in disease activity with conventional disease-modifying antirheumatic drugs. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(3):R76.
 161. Guler-Yuksel M, Allaart CF, Goekoop-Ruiterman YP, de Vries-Bouwstra JK, van Groenendael JH, Mallee C, et al. Changes in hand and generalised bone mineral density in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(3):330-6.
 162. Schett G, Firestein GS. Mr Outside and Mr Inside: classic and alternative views on the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(5):787-9.
 163. Haugeberg G, Green MJ, Quinn MA, Marzo-Ortega H, Proudman S, Karim Z, et al. Hand bone loss in early undifferentiated arthritis: evaluating bone mineral density loss before the development of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2006;65(6):736-40.
 164. van Staa TP, Geusens P, Bijlsma JW, Leufkens HG, Cooper C. Clinical assessment of the long-term risk of fracture in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54(10):3104-12.
 165. Amin S, Gabriel SE, Achenbach SJ, Atkinson EJ, Melton LJ, 3rd. Are young women and men with rheumatoid arthritis at risk for fragility fractures? A population-based study. *J Rheumatol.* 2013;40(10):1669-76.
 166. Ochi K, Inoue E, Furuya T, Ikari K, Toyama Y, Taniguchi A, et al. Ten-year incidences of self-reported non-vertebral fractures in Japanese patients with rheumatoid arthritis: discrepancy between disease activity control and the incidence of non-vertebral fracture. *Osteoporos Int.* 2015;26(3):961-8.
 167. Klop C, de Vries F, Bijlsma JW, Leufkens HG, Welsing PM. Predicting the 10-year risk of hip and major osteoporotic fracture in rheumatoid arthritis and in the general population: an independent validation and update of UK FRAX without bone mineral density. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(12):2095-100.
 168. Lekamwasam S, Adachi JD, Agnusdei D, Bilezikian J, Boonen S, Borgstrom F, et al. A framework for the development of guidelines for the management of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2012;23(9):2257-76.
 169. Saag KG, Zanchetta JR, Devogelaer JP, Adler RA, Eastell R, See K, et al. Effects of teriparatide versus alendronate for treating glucocorticoid-induced osteoporosis: thirty-six-

- month results of a randomized, double-blind, controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2009;60(11):3346-55.
170. Manara M, Sinigaglia L. Bone and TNF in rheumatoid arthritis: clinical implications. *RMD Open.* 2015;1(Suppl 1):e000065.
 171. Gravallesse EM, Harada Y, Wang JT, Gorn AH, Thornhill TS, Goldring SR. Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Am J Pathol.* 1998;152(4):943-51.
 172. Monach PA, Mathis D, Benoist C. The K/BxN arthritis model. *Curr Protoc Immunol.* 2008;Chapter 15:Unit 15 22.
 173. Pettit AR, Ji H, von Stechow D, Muller R, Goldring SR, Choi Y, et al. TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis. *Am J Pathol.* 2001;159(5):1689-99.
 174. Schett G, Redlich K, Hayer S, Zwerina J, Bolon B, Dunstan C, et al. Osteoprotegerin protects against generalized bone loss in tumor necrosis factor-transgenic mice. *Arthritis Rheum.* 2003;48(7):2042-51.
 175. Herrak P, Gortz B, Hayer S, Redlich K, Reiter E, Gasser J, et al. Zoledronic acid protects against local and systemic bone loss in tumor necrosis factor-mediated arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50(7):2327-37.
 176. Sims NA, Green JR, Glatt M, Schlicht S, Martin TJ, Gillespie MT, et al. Targeting osteoclasts with zoledronic acid prevents bone destruction in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50(7):2338-46.
 177. Jarrett SJ, Conaghan PG, Sloan VS, Papanastasiou P, Ortmann CE, O'Connor PJ, et al. Preliminary evidence for a structural benefit of the new bisphosphonate zoledronic acid in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54(5):1410-4.
 178. Deodhar A, Dore RK, Mandel D, Schechtman J, Shergy W, Trapp R, et al. Denosumab-mediated increase in hand bone mineral density associated with decreased progression of bone erosion in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2010;62(4):569-74.
 179. Cohen SB, Dore RK, Lane NE, Ory PA, Peterfy CG, Sharp JT, et al. Denosumab treatment effects on structural damage, bone mineral density, and bone turnover in rheumatoid arthritis: a twelve-month, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II clinical trial. *Arthritis Rheum.* 2008;58(5):1299-309.
 180. Sugimoto T, Matsumoto T, Hosoi T, Miki T, Gorai I, Yoshikawa H, et al. Three-year denosumab treatment in postmenopausal Japanese women and men with osteoporosis: results from a 1-year open-label extension of the Denosumab Fracture Intervention Randomized Placebo Controlled Trial (DIRECT). *Osteoporos Int.* 2015;26(2):765-74.
 181. Wei S, Kitaura H, Zhou P, Ross FP, Teitelbaum SL. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest.* 2005;115(2):282-90.
 182. Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol.* 1998;160(7):3513-21.
 183. Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest.* 1999;103(9):1345-52.
 184. Lubberts E, van den Bersselaar L, Oppers-Walgreen B, Schwarzenberger P, Coenen-de Roo CJ, Kolls JK, et al. IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF-kappa B ligand/osteoprotegerin balance. *J Immunol.* 2003;170(5):2655-62.
 185. Hashizume M, Hayakawa N, Mihara M. IL-6 trans-signalling directly induces RANKL on fibroblast-like synovial cells and is involved in RANKL induction by TNF-alpha and IL-17. *Rheumatology (Oxford).* 2008;47(11):1635-40.

186. Yao Z, Li P, Zhang Q, Schwarz EM, Keng P, Arbini A, et al. Tumor necrosis factor- α increases circulating osteoclast precursor numbers by promoting their proliferation and differentiation in the bone marrow through up-regulation of c-Fms expression. *J Biol Chem.* 2006;281(17):11846-55.
187. Jimi E, Nakamura I, Duong LT, Ikebe T, Takahashi N, Rodan GA, et al. Interleukin 1 induces multinucleation and bone-resorbing activity of osteoclasts in the absence of osteoblasts/stromal cells. *Exp Cell Res.* 1999;247(1):84-93.
188. Suzuki M, Hashizume M, Yoshida H, Shiina M, Mihara M. Intercellular adhesion molecule-1 on synovial cells attenuated interleukin-6-induced inhibition of osteoclastogenesis induced by receptor activator for nuclear factor kappaB ligand. *Clin Exp Immunol.* 2011;163(1):88-95.
189. Axmann R, Bohm C, Kronke G, Zwerina J, Smolen J, Schett G. Inhibition of interleukin-6 receptor directly blocks osteoclast formation in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum.* 2009;60(9):2747-56.
190. Boe A, Baiocchi M, Carbonatto M, Papoian R, Serlupi-Crescenzi O. Interleukin 6 knock-out mice are resistant to antigen-induced experimental arthritis. *Cytokine.* 1999;11(12):1057-64.
191. Smolen JS, Van Der Heijde DM, St Clair EW, Emery P, Bathon JM, Keystone E, et al. Predictors of joint damage in patients with early rheumatoid arthritis treated with high-dose methotrexate with or without concomitant infliximab: results from the ASPIRE trial. *Arthritis Rheum.* 2006;54(3):702-10.
192. Nishimoto N, Hashimoto J, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, et al. Study of active controlled monotherapy used for rheumatoid arthritis, an IL-6 inhibitor (SAMURAI): evidence of clinical and radiographic benefit from an x ray reader-blinded randomised controlled trial of tocilizumab. *Ann Rheum Dis.* 2007;66(9):1162-7.
193. Lee EB, Fleischmann R, Hall S, Wilkinson B, Bradley JD, Gruben D, et al. Tofacitinib versus methotrexate in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2014;370(25):2377-86.
194. Haavardsholm EA, Boyesen P, Ostergaard M, Schildvold A, Kvien TK. Magnetic resonance imaging findings in 84 patients with early rheumatoid arthritis: bone marrow oedema predicts erosive progression. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(6):794-800.
195. Hetland ML, Ejbjerg B, Horslev-Petersen K, Jacobsen S, Vestergaard A, Jurik AG, et al. MRI bone oedema is the strongest predictor of subsequent radiographic progression in early rheumatoid arthritis. Results from a 2-year randomised controlled trial (CIMESTRA). *Ann Rheum Dis.* 2009;68(3):384-90.
196. Dalbeth N, Smith T, Gray S, Doyle A, Antill P, Lobo M, et al. Cellular characterisation of magnetic resonance imaging bone oedema in rheumatoid arthritis; implications for pathogenesis of erosive disease. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(2):279-82.
197. Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, Tsuji G, Nakazawa T, Kawano S, et al. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med.* 2007;146(11):797-808.
198. Saeki Y, Kudo-Tanaka E, Ohshima S, Matsushita M, Tsuji S, Maeda Y, et al. Baseline anti-citrullinated peptide antibody (ACPA) titers and serum interleukin-6 (IL-6) levels possibly predict progression of bone destruction in early stages of rheumatoid arthritis (ERA). *Rheumatol Int.* 2013;33(2):451-6.
199. Hecht C, Englbrecht M, Rech J, Schmidt S, Araujo E, Engelke K, et al. Additive effect of anti-citrullinated protein antibodies and rheumatoid factor on bone erosions in patients with RA. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(12):2151-6.
200. Harre U, Kittan NA, Schett G. Autoantibody-mediated bone loss. *Curr Osteoporos Rep.* 2014;12(1):17-21.
201. Mathsson L, Lampa J, Mullazehi M, Ronnelid J. Immune complexes from rheumatoid arthritis synovial fluid induce Fc γ RIIa dependent and rheumatoid factor correlated

- production of tumour necrosis factor- α by peripheral blood mononuclear cells. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(3):R64.
202. Clavel C, Nogueira L, Laurent L, Iobagiu C, Vincent C, Sebbag M, et al. Induction of macrophage secretion of tumor necrosis factor α through Fc γ receptor IIa engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen. *Arthritis Rheum*. 2008;58(3):678-88.
 203. Seeling M, Hillen hoff U, David JP, Schett G, Tuckermann J, Lux A, et al. Inflammatory monocytes and Fc γ receptor IV on osteoclasts are critical for bone destruction during inflammatory arthritis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(26):10729-34.
 204. Harre U, Lang SC, Pfeifle R, Rombouts Y, Fruhbeisser S, Amara K, et al. Glycosylation of immunoglobulin G determines osteoclast differentiation and bone loss. *Nat Commun*. 2015;6:6651.
 205. Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science*. 2006;313(5787):670-3.
 206. Kleyer A, Finzel S, Rech J, Manger B, Krieter M, Faustini F, et al. Bone loss before the clinical onset of rheumatoid arthritis in subjects with anticitrullinated protein antibodies. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(5):854-60.
 207. Berglin E, Padyukov L, Sundin U, Hallmans G, Stenlund H, Van Venrooij WJ, et al. A combination of autoantibodies to cyclic citrullinated peptide (CCP) and HLA-DRB1 locus antigens is strongly associated with future onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2004;6(4):R303-8.
 208. Crane JL, Cao X. Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF- β signaling in bone remodeling. *J Clin Invest*. 2014;124(2):466-72.
 209. Monroe DG, McGee-Lawrence ME, Oursler MJ, Westendorf JJ. Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease. *Gene*. 2012;492(1):1-18.
 210. Sanchez-Duffhues G, Hiepen C, Knaus P, Ten Dijke P. Bone morphogenetic protein signaling in bone homeostasis. *Bone*. 2015;80:43-59.
 211. Regard JB, Zhong Z, Williams BO, Yang Y. Wnt signaling in bone development and disease: making stronger bone with Wnts. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(12).
 212. Morvan F, Boulukos K, Clement-Lacroix P, Roman Roman S, Suc-Royer I, Vayssiere B, et al. Deletion of a single allele of the Dkk1 gene leads to an increase in bone formation and bone mass. *J Bone Miner Res*. 2006;21(6):934-45.
 213. Li J, Sarosi I, Cattley RC, Pretorius J, Asuncion F, Grisanti M, et al. Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia. *Bone*. 2006;39(4):754-66.
 214. Bodine PV, Zhao W, Kharode YP, Bex FJ, Lambert AJ, Goad MB, et al. The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 is a negative regulator of trabecular bone formation in adult mice. *Mol Endocrinol*. 2004;18(5):1222-37.
 215. Yao W, Cheng Z, Shahnazari M, Dai W, Johnson ML, Lane NE. Overexpression of secreted frizzled-related protein 1 inhibits bone formation and attenuates parathyroid hormone bone anabolic effects. *J Bone Miner Res*. 2010;25(2):190-9.
 216. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med*. 2007;13(2):156-63.
 217. Matzelle MM, Gallant MA, Condon KW, Walsh NC, Manning CA, Stein GS, et al. Resolution of inflammation induces osteoblast function and regulates the Wnt signaling pathway. *Arthritis Rheum*. 2012;64(5):1540-50.
 218. Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, et al. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem*. 2005;280(20):19883-7.
 219. van Lierop AH, Hamdy NA, van Egmond ME, Bakker E, Dikkers FG, Papapoulos SE. Van Buchem disease: clinical, biochemical, and densitometric features of patients and disease carriers. *J Bone Miner Res*. 2013;28(4):848-54.

220. Staehling-Hampton K, Proll S, Paeper BW, Zhao L, Charmley P, Brown A, et al. A 52-kb deletion in the SOST-MEOX1 intergenic region on 17q12-q21 is associated with van Buchem disease in the Dutch population. *Am J Med Genet.* 2002;110(2):144-52.
221. Balemans W, Ebeling M, Patel N, Van Hul E, Olson P, Dioszegi M, et al. Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). *Hum Mol Genet.* 2001;10(5):537-43.
222. Hamersma H, Gardner J, Beighton P. The natural history of sclerosteosis. *Clin Genet.* 2003;63(3):192-7.
223. Li X, Ominsky MS, Niu QT, Sun N, Daugherty B, D'Agostin D, et al. Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. *J Bone Miner Res.* 2008;23(6):860-9.
224. Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, et al. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J.* 2003;22(23):6267-76.
225. Chen G, Deng C, Li YP. TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci.* 2012;8(2):272-88.
226. Moller Dohn U, Boonen A, Hetland ML, Hansen MS, Knudsen LS, Hansen A, et al. Erosive progression is minimal, but erosion healing rare, in patients with rheumatoid arthritis treated with adalimumab. A 1 year investigator-initiated follow-up study using high-resolution computed tomography as the primary outcome measure. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(10):1585-90.
227. Dohn UM, Ejbjerg B, Boonen A, Hetland ML, Hansen MS, Knudsen LS, et al. No overall progression and occasional repair of erosions despite persistent inflammation in adalimumab-treated rheumatoid arthritis patients: results from a longitudinal comparative MRI, ultrasonography, CT and radiography study. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(2):252-8.
228. Finzel S, Rech J, Schmidt S, Engelke K, Englbrecht M, Stach C, et al. Repair of bone erosions in rheumatoid arthritis treated with tumour necrosis factor inhibitors is based on bone apposition at the base of the erosion. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(9):1587-93.
229. Finzel S, Rech J, Schmidt S, Engelke K, Englbrecht M, Schett G. Interleukin-6 receptor blockade induces limited repair of bone erosions in rheumatoid arthritis: a micro CT study. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(3):396-400.
230. Gilbert L, He X, Farmer P, Boden S, Kozlowski M, Rubin J, et al. Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor-alpha. *Endocrinology.* 2000;141(11):3956-64.
231. Gilbert L, He X, Farmer P, Rubin J, Drissi H, van Wijnen AJ, et al. Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2alpha A) is inhibited by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem.* 2002;277(4):2695-701.
232. Kaneki H, Guo R, Chen D, Yao Z, Schwarz EM, Zhang YE, et al. Tumor necrosis factor promotes Runx2 degradation through up-regulation of Smurf1 and Smurf2 in osteoblasts. *J Biol Chem.* 2006;281(7):4326-33.
233. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res.* 1998;13(5):793-802.
234. Stashenko P, Dewhirst FE, Rooney ML, Desjardins LA, Heeley JD. Interleukin-1 beta is a potent inhibitor of bone formation in vitro. *J Bone Miner Res.* 1987;2(6):559-65.
235. Hengartner NE, Fiedler J, Ignatius A, Brenner RE. IL-1beta inhibits human osteoblast migration. *Mol Med.* 2013;19:36-42.
236. Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, Levine AC. Cross-talk between the interleukin-6 and prostaglandin E(2) signaling systems results in enhancement of osteoclastogenesis through effects on the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) ligand/RANK system. *Endocrinology.* 2005;146(4):1991-8.

237. Walsh NC, Reinwald S, Manning CA, Condon KW, Iwata K, Burr DB, et al. Osteoblast function is compromised at sites of focal bone erosion in inflammatory arthritis. *J Bone Miner Res.* 2009;24(9):1572-85.
238. de Rooy DP, Yeremenko NG, Wilson AG, Knevel R, Lindqvist E, Saxne T, et al. Genetic studies on components of the Wnt signalling pathway and the severity of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(5):769-75.
239. Chen XX, Baum W, Dwyer D, Stock M, Schwabe K, Ke HZ, et al. Sclerostin inhibition reverses systemic, periarticular and local bone loss in arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(10):1732-6.
240. Balemans W, Van Hul W. The genetics of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 in bone: a story of extremes. *Endocrinology.* 2007;148(6):2622-9.
241. Frontali M, Stomeo C, Dallapiccola B. Osteoporosis-pseudoglioma syndrome: report of three affected sibs and an overview. *Am J Med Genet.* 1985;22(1):35-47.
242. Somer H, Palotie A, Somer M, Hoikka V, Peltonen L. Osteoporosis-pseudoglioma syndrome: clinical, morphological, and biochemical studies. *J Med Genet.* 1988;25(8):543-9.
243. Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, et al. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell.* 2001;107(4):513-23.
244. Lev D, Binson I, Foldes AJ, Watemberg N, Lerman-Sagie T. Decreased bone density in carriers and patients of an Israeli family with the osteoporosis-pseudoglioma syndrome. *Isr Med Assoc J.* 2003;5(6):419-21.
245. Ai M, Heeger S, Bartels CF, Schelling DK, Osteoporosis-Pseudoglioma Collaborative G. Clinical and molecular findings in osteoporosis-pseudoglioma syndrome. *Am J Hum Genet.* 2005;77(5):741-53.
246. Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, et al. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med.* 2002;346(20):1513-21.
247. Little RD, Carulli JP, Del Mastro RG, Dupuis J, Osborne M, Folz C, et al. A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet.* 2002;70(1):11-9.
248. Van Wesenbeeck L, Cleiren E, Gram J, Beals RK, Benichou O, Scopelliti D, et al. Six novel missense mutations in the LDL receptor-related protein 5 (LRP5) gene in different conditions with an increased bone density. *Am J Hum Genet.* 2003;72(3):763-71.
249. Kwee ML, Balemans W, Cleiren E, Gille JJ, Van Der Blij F, Sepers JM, et al. An autosomal dominant high bone mass phenotype in association with craniosynostosis in an extended family is caused by an LRP5 missense mutation. *J Bone Miner Res.* 2005;20(7):1254-60.
250. Rickels MR, Zhang X, Mumm S, Whyte MP. Oropharyngeal skeletal disease accompanying high bone mass and novel LRP5 mutation. *J Bone Miner Res.* 2005;20(5):878-85.
251. Cummings SR, Nevitt MC, Browner WS, Stone K, Fox KM, Ensrud KE, et al. Risk factors for hip fracture in white women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *N Engl J Med.* 1995;332(12):767-73.
252. Flicker L, Hopper JL, Rodgers L, Kaymakci B, Green RM, Wark JD. Bone density determinants in elderly women: a twin study. *J Bone Miner Res.* 1995;10(11):1607-13.
253. Steelman J, Zeitler P. Osteoporosis in pediatrics. *Pediatr Rev.* 2001;22(2):56-65.
254. Bilezikian JP. Osteoporosis in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(10):3431-4.
255. Van Pottelbergh I, Goemaere S, Zmierzczak H, De Bacquer D, Kaufman JM. Deficient acquisition of bone during maturation underlies idiopathic osteoporosis in men: evidence from a three-generation family study. *J Bone Miner Res.* 2003;18(2):303-11.
256. Baudoin C, Cohen-Solal ME, Beaudreuil J, De Vernejoul MC. Genetic and environmental factors affect bone density variances of families of men and women with osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(5):2053-9.
257. Hartikka H, Makitie O, Mannikko M, Doria AS, Daneman A, Cole WG, et al. Heterozygous mutations in the LDL receptor-related protein 5 (LRP5) gene are associated with primary osteoporosis in children. *J Bone Miner Res.* 2005;20(5):783-9.

258. Crabbe P, Balemans W, Willaert A, van Pottelbergh I, Cleiren E, Coucke PJ, et al. Missense mutations in LRP5 are not a common cause of idiopathic osteoporosis in adult men. *J Bone Miner Res.* 2005;20(11):1951-9.
259. Koller DL, Ichikawa S, Johnson ML, Lai D, Xuei X, Edenberg HJ, et al. Contribution of the LRP5 gene to normal variation in peak BMD in women. *J Bone Miner Res.* 2005;20(1):75-80.
260. van Meurs JB, Rivadeneira F, Jhamai M, Hugens W, Hofman A, van Leeuwen JP, et al. Common genetic variation of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 and 6 genes determines fracture risk in elderly white men. *J Bone Miner Res.* 2006;21(1):141-50.
261. Ferrari SL, Deutsch S, Baudoin C, Cohen-Solal M, Ostertag A, Antonarakis SE, et al. LRP5 gene polymorphisms and idiopathic osteoporosis in men. *Bone.* 2005;37(6):770-5.
262. Ferrari SL, Deutsch S, Choudhury U, Chevalley T, Bonjour JP, Dermitzakis ET, et al. Polymorphisms in the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) gene are associated with variation in vertebral bone mass, vertebral bone size, and stature in whites. *Am J Hum Genet.* 2004;74(5):866-75.
263. Koay MA, Woon PY, Zhang Y, Miles LJ, Duncan EL, Ralston SH, et al. Influence of LRP5 polymorphisms on normal variation in BMD. *J Bone Miner Res.* 2004;19(10):1619-27.
264. Bollerslev J, Wilson SG, Dick IM, Islam FM, Ueland T, Palmer L, et al. LRP5 gene polymorphisms predict bone mass and incident fractures in elderly Australian women. *Bone.* 2005;36(4):599-606.
265. Brixen K, Beckers S, Peeters A, PETERS E, Balemans W, Nielsen TL, et al. Polymorphisms in the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) gene are associated with peak bone mass in non-sedentary men: results from the Odense androgen study. *Calcif Tissue Int.* 2007;81(6):421-9.
266. Liu K, Tan LJ, Wang P, Chen XD, Zhu LH, Zeng Q, et al. Functional relevance for associations between osteoporosis and genetic variants. *PLoS One.* 2017;12(4):e0174808.
267. Koh JM, Jung MH, Hong JS, Park HJ, Chang JS, Shin HD, et al. Association between bone mineral density and LDL receptor-related protein 5 gene polymorphisms in young Korean men. *J Korean Med Sci.* 2004;19(3):407-12.
268. Lau HH, Ng MY, Ho AY, Luk KD, Kung AW. Genetic and environmental determinants of bone mineral density in Chinese women. *Bone.* 2005;36(4):700-9.
269. Willnow TE, Nykjaer A, Herz J. Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins. *Nat Cell Biol.* 1999;1(6):E157-62.
270. Willnow TE. The low-density lipoprotein receptor gene family: multiple roles in lipid metabolism. *J Mol Med (Berl).* 1999;77(3):306-15.
271. Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, et al. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature.* 2000;407(6803):530-5.
272. Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* 1997;11(24):3286-305.
273. Moon RT, Bowerman B, Boutros M, Perrimon N. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science.* 2002;296(5573):1644-6.
274. Mao B, Wu W, Li Y, Hoppe D, Stannek P, Glinka A, et al. LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature.* 2001;411(6835):321-5.
275. Ai M, Holmen SL, Van Hul W, Williams BO, Warman ML. Reduced affinity to and inhibition by DKK1 form a common mechanism by which high bone mass-associated missense mutations in LRP5 affect canonical Wnt signaling. *Mol Cell Biol.* 2005;25(12):4946-55.
276. Balemans W, Patel N, Ebeling M, Van Hul E, Wuyts W, Lacza C, et al. Identification of a 52 kb deletion downstream of the SOST gene in patients with van Buchem disease. *J Med Genet.* 2002;39(2):91-7.
277. Ellies DL, Viviano B, McCarthy J, Rey JP, Itasaki N, Saunders S, et al. Bone density ligand, Sclerostin, directly interacts with LRP5 but not LRP5G171V to modulate Wnt activity. *J Bone Miner Res.* 2006;21(11):1738-49.

278. Yadav VK, Ryu JH, Suda N, Tanaka KF, Gingrich JA, Schutz G, et al. Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. *Cell*. 2008;135(5):825-37.
279. Bliziotis M. Update in serotonin and bone. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(9):4124-32.
280. Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med*. 2009;60:355-66.
281. Yadav VK, Oury F, Suda N, Liu ZW, Gao XB, Confavreux C, et al. A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure. *Cell*. 2009;138(5):976-89.
282. Karsenty G, Oury F. The central regulation of bone mass, the first link between bone remodeling and energy metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(11):4795-801.
283. Yadav VK, Balaji S, Suresh PS, Liu XS, Lu X, Li Z, et al. Pharmacological inhibition of gut-derived serotonin synthesis is a potential bone anabolic treatment for osteoporosis. *Nat Med*. 2010;16(3):308-12.
284. Karsenty G, Yadav VK. Regulation of bone mass by serotonin: molecular biology and therapeutic implications. *Annu Rev Med*. 2011;62:323-31.
285. Sawakami K, Robling AG, Ai M, Pitner ND, Liu D, Warden SJ, et al. The Wnt co-receptor LRP5 is essential for skeletal mechanotransduction but not for the anabolic bone response to parathyroid hormone treatment. *J Biol Chem*. 2006;281(33):23698-711.
286. Babij P, Zhao W, Small C, Kharode Y, Yaworsky PJ, Bouxsein ML, et al. High bone mass in mice expressing a mutant LRP5 gene. *J Bone Miner Res*. 2003;18(6):960-74.
287. Modder UI, Achenbach SJ, Amin S, Riggs BL, Melton LJ, 3rd, Khosla S. Relation of serum serotonin levels to bone density and structural parameters in women. *J Bone Miner Res*. 2010;25(2):415-22.
288. Frost M, Andersen TE, Yadav V, Brixen K, Karsenty G, Kassem M. Patients with high-bone-mass phenotype owing to Lrp5-T253I mutation have low plasma levels of serotonin. *J Bone Miner Res*. 2010;25(3):673-5.
289. Frost M, Andersen T, Gossiel F, Hansen S, Bollerslev J, van Hul W, et al. Levels of serotonin, sclerostin, bone turnover markers as well as bone density and microarchitecture in patients with high-bone-mass phenotype due to a mutation in Lrp5. *J Bone Miner Res*. 2011;26(8):1721-8.
290. Saarinen A, Saukkonen T, Kivela T, Lahtinen U, Laine C, Somer M, et al. Low density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) mutations and osteoporosis, impaired glucose metabolism and hypercholesterolaemia. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010;72(4):481-8.
291. Verdel BM, Souverein PC, Egberts TC, van Staa TP, Leufkens HG, de Vries F. Use of antidepressant drugs and risk of osteoporotic and non-osteoporotic fractures. *Bone*. 2010;47(3):604-9.
292. Warden SJ, Hassett SM, Bond JL, Rydberg J, Grogg JD, Hilles EL, et al. Psychotropic drugs have contrasting skeletal effects that are independent of their effects on physical activity levels. *Bone*. 2010;46(4):985-92.
293. Bab I, Yirmiye R. Depression, selective serotonin reuptake inhibitors, and osteoporosis. *Curr Osteoporosis Rep*. 2010;8(4):185-91.
294. Kopp S, Alstergren P. Blood serotonin and joint pain in seropositive versus seronegative rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm*. 2002;11(4):211-7.
295. Reynolds T. Declaration of Helsinki revised. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(22):1801-3.
296. European Association for Cardiovascular P, Rehabilitation, Reiner Z, Catapano AL, De Backer G, Graham I, et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J*. 2011;32(14):1769-818.
297. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Bohm M, et al. 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management

- of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2013;34(28):2159-219.
298. Bruce B, Fries JF. The Stanford Health Assessment Questionnaire: a review of its history, issues, progress, and documentation. *J Rheumatol*. 2003;30(1):167-78.
 299. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412-9.
 300. van der Heijde D. How to read radiographs according to the Sharp/van der Heijde method. *J Rheumatol*. 2000;27(1):261-3.
 301. Wolak A, Slomka PJ, Fish MB, Lorenzo S, Berman DS, Germano G. Quantitative diagnostic performance of myocardial perfusion SPECT with attenuation correction in women. *J Nucl Med*. 2008;49(6):915-22.
 302. Links JM, Becker LC, Anstett F. Clinical significance of apical thinning after attenuation correction. *J Nucl Cardiol*. 2004;11(1):26-31.
 303. Oudkerk M, Stillman AE, Halliburton SS, Kalender WA, Mohlenkamp S, McCollough CH, et al. Coronary artery calcium screening: current status and recommendations from the European Society of Cardiac Radiology and North American Society for Cardiovascular Imaging. *Eur Radiol*. 2008;18(12):2785-807.
 304. Laroche M, Pecourneau V, Blain H, Breuil V, Chapurlat R, Cortet B, et al. Osteoporosis and ischemic cardiovascular disease. *Joint Bone Spine*. 2017;84(4):427-32.
 305. Barengolts EI, Berman M, Kukreja SC, Kouznetsova T, Lin C, Chomka EV. Osteoporosis and coronary atherosclerosis in asymptomatic postmenopausal women. *Calcif Tissue Int*. 1998;62(3):209-13.
 306. Shaffer JR, Kammerer CM, Rainwater DL, O'Leary DH, Bruder JM, Bauer RL, et al. Decreased bone mineral density is correlated with increased subclinical atherosclerosis in older, but not younger, Mexican American women and men: the San Antonio Family Osteoporosis Study. *Calcif Tissue Int*. 2007;81(6):430-41.
 307. Marcovitz PA, Tran HH, Franklin BA, O'Neill WW, Yerkey M, Boura J, et al. Usefulness of bone mineral density to predict significant coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 2005;96(8):1059-63.
 308. Paccou J, Edwards MH, Ward KA, Jameson KA, Moss CL, Harvey NC, et al. Ischemic heart disease is associated with lower cortical volumetric bone mineral density of distal radius. *Osteoporos Int*. 2015;26(7):1893-901.
 309. Ness J, Aronow WS. Comparison of prevalence of atherosclerotic vascular disease in postmenopausal women with osteoporosis or osteopenia versus without osteoporosis or osteopenia. *Am J Cardiol*. 2006;97(10):1427-8.
 310. Magnus JH, Broussard DL. Relationship between bone mineral density and myocardial infarction in US adults. *Osteoporos Int*. 2005;16(12):2053-62.
 311. Lee HT, Shin J, Min SY, Lim YH, Kim KS, Kim SG, et al. Relationship between bone mineral density and a 10-year risk for coronary artery disease in a healthy Korean population: the Korea National Health and Nutrition Examination Survey 2008-2010. *Coron Artery Dis*. 2015;26(1):66-71.
 312. Szulc P, Samelson EJ, Kiel DP, Delmas PD. Increased bone resorption is associated with increased risk of cardiovascular events in men: the MINOS study. *J Bone Miner Res*. 2009;24(12):2023-31.
 313. Wiklund P, Nordstrom A, Jansson JH, Weinehall L, Nordstrom P. Low bone mineral density is associated with increased risk for myocardial infarction in men and women. *Osteoporos Int*. 2012;23(3):963-70.
 314. von Muhlen D, Allison M, Jassal SK, Barrett-Connor E. Peripheral arterial disease and osteoporosis in older adults: the Rancho Bernardo Study. *Osteoporos Int*. 2009;20(12):2071-8.

315. Collins TC, Ewing SK, Diem SJ, Taylor BC, Orwoll ES, Cummings SR, et al. Peripheral arterial disease is associated with higher rates of hip bone loss and increased fracture risk in older men. *Circulation*. 2009;119(17):2305-12.
316. Shao JS, Cheng SL, Sadhu J, Towler DA. Inflammation and the osteogenic regulation of vascular calcification: a review and perspective. *Hypertension*. 2010;55(3):579-92.
317. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420(6917):868-74.
318. Walsh NC, Gravallese EM. Bone loss in inflammatory arthritis: mechanisms and treatment strategies. *Curr Opin Rheumatol*. 2004;16(4):419-27.
319. Rajzbaum G, Bezie Y. Postmenopausal osteoporosis and atheroma. *Joint Bone Spine*. 2006;73(6):661-6.
320. Hofbauer LC, Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA*. 2004;292(4):490-5.
321. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*. 1998;12(9):1260-8.
322. Morony S, Tintut Y, Zhang Z, Cattley RC, Van G, Dwyer D, et al. Osteoprotegerin inhibits vascular calcification without affecting atherosclerosis in *ldlr*(-/-) mice. *Circulation*. 2008;117(3):411-20.
323. Perez de Ciriza C, Moreno M, Restituto P, Bastarrika G, Simon I, Colina I, et al. Circulating osteoprotegerin is increased in the metabolic syndrome and associates with subclinical atherosclerosis and coronary arterial calcification. *Clin Biochem*. 2014;47(18):272-8.
324. Bjerre M, Hilden J, Kastrup J, Skoog M, Hansen JF, Kolmos HJ, et al. Osteoprotegerin independently predicts mortality in patients with stable coronary artery disease: the CLARICOR trial. *Scand J Clin Lab Invest*. 2014;74(8):657-64.
325. Roysland R, Masson S, Omland T, Milani V, Bjerre M, Flyvbjerg A, et al. Prognostic value of osteoprotegerin in chronic heart failure: The GISSI-HF trial. *Am Heart J*. 2010;160(2):286-93.
326. Ozkok A, Caliskan Y, Sakaci T, Erten G, Karahan G, Ozel A, et al. Osteoprotegerin/RANKL axis and progression of coronary artery calcification in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012;7(6):965-73.
327. Venuraju SM, Yerramasu A, Corder R, Lahiri A. Osteoprotegerin as a predictor of coronary artery disease and cardiovascular mortality and morbidity. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(19):2049-61.
328. Sandberg WJ, Yndestad A, Oie E, Smith C, Ueland T, Ovchinnikova O, et al. Enhanced T-cell expression of RANK ligand in acute coronary syndrome: possible role in plaque destabilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(4):857-63.
329. Wang L, Hu XB, Zhang W, Wu LD, Liu YS, Hu B, et al. Dickkopf-1 as a novel predictor is associated with risk stratification by GRACE risk scores for predictive value in patients with acute coronary syndrome: a retrospective research. *PLoS One*. 2013;8(1):e54731.
330. Ueland T, Otterdal K, Lekva T, Halvorsen B, Gabrielsen A, Sandberg WJ, et al. Dickkopf-1 enhances inflammatory interaction between platelets and endothelial cells and shows increased expression in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(8):1228-34.
331. Lattanzio S, Santilli F, Liani R, Vazzana N, Ueland T, Di Fulvio P, et al. Circulating dickkopf-1 in diabetes mellitus: association with platelet activation and effects of improved metabolic control and low-dose aspirin. *J Am Heart Assoc*. 2014;3(4).
332. Cannata-Andia JB, Roman-Garcia P, Hruska K. The connections between vascular calcification and bone health. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(11):3429-36.
333. Goliasch G, Wiesbauer F, Kastl SP, Katsaros KM, Blessberger H, Maurer G, et al. Premature myocardial infarction is associated with low serum levels of Wnt-1. *Atherosclerosis*. 2012;222(1):251-6.
334. Kim KI, Park KU, Chun EJ, Choi SI, Cho YS, Youn TJ, et al. A novel biomarker of coronary atherosclerosis: serum DKK1 concentration correlates with coronary artery calcification and atherosclerotic plaques. *J Korean Med Sci*. 2011;26(9):1178-84.

335. Motovska Z, Vichova T, Doktorova M, Labos M, Maly M, Widimsky P. Serum Dickkopf-1 signaling and calcium deposition in aortic valve are significantly related to the presence of concomitant coronary atherosclerosis in patients with symptomatic calcified aortic stenosis. *J Transl Med.* 2015;13:63.
336. Goncalves FL, Elias RM, dos Reis LM, Gracioli FG, Zampieri FG, Oliveira RB, et al. Serum sclerostin is an independent predictor of mortality in hemodialysis patients. *BMC Nephrol.* 2014;15:190.
337. Burton DW, Brandt DW, Deftos LJ. Parathyroid hormone-related protein in the cardiovascular system. *Endocrinology.* 1994;135(1):253-61.
338. Roche B, Vanden-Bossche A, Malaval L, Normand M, Jannot M, Chaux R, et al. Parathyroid hormone 1-84 targets bone vascular structure and perfusion in mice: impacts of its administration regimen and of ovariectomy. *J Bone Miner Res.* 2014;29(7):1608-18.
339. Diamond TW, Botha JR, Wing J, Meyers AM, Kalk WJ. Parathyroid hypertension. A reversible disorder. *Arch Intern Med.* 1986;146(9):1709-12.
340. Moe SM. Klotho: a master regulator of cardiovascular disease? *Circulation.* 2012;125(18):2181-3.
341. Prie D, Groupe de Travail Mixte SSNBdCVACdLiRC. [The couple fibroblast growth factor 23 (FGF23)/Klotho]. *Ann Biol Clin (Paris).* 2015;73(3):299-304.
342. Wesseling-Perry K, Juppner H. The osteocyte in CKD: new concepts regarding the role of FGF23 in mineral metabolism and systemic complications. *Bone.* 2013;54(2):222-9.
343. Brandenburg VM, Kleber ME, Vervloet MG, Tomaschitz A, Pilz S, Stojakovic T, et al. Fibroblast growth factor 23 (FGF23) and mortality: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *Atherosclerosis.* 2014;237(1):53-9.
344. Arnlov J, Carlsson AC, Sundstrom J, Ingelsson E, Larsson A, Lind L, et al. Serum FGF23 and risk of cardiovascular events in relation to mineral metabolism and cardiovascular pathology. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2013;8(5):781-6.
345. di Giuseppe R, Kuhn T, Hirche F, Buijsse B, Dierkes J, Fritsche A, et al. Plasma fibroblast growth factor 23 and risk of cardiovascular disease: results from the EPIC-Germany case-cohort study. *Eur J Epidemiol.* 2015;30(2):131-41.
346. Schoppet M, Hofbauer LC, Brinschelle-Schmal N, Varennes A, Goudable J, Richard M, et al. Serum level of the phosphaturic factor FGF23 is associated with abdominal aortic calcification in men: the STRAMBO study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(4):E575-83.
347. Mirza MA, Karlsson MK, Mellstrom D, Orwoll E, Ohlsson C, Ljunggren O, et al. Serum fibroblast growth factor-23 (FGF-23) and fracture risk in elderly men. *J Bone Miner Res.* 2011;26(4):857-64.
348. Lane NE, Parimi N, Corr M, Yao W, Cauley JA, Nielson CM, et al. Association of serum fibroblast growth factor 23 (FGF23) and incident fractures in older men: the Osteoporotic Fractures in Men (MrOS) study. *J Bone Miner Res.* 2013;28(11):2325-32.
349. Lafage-Proust MH, Prisby R, Roche B, Vico L. Bone vascularization and remodeling. *Joint Bone Spine.* 2010;77(6):521-4.
350. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993;362(6423):801-9.
351. Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res.* 2006;99(10):1044-59.
352. Burnett JR, Vasikaran SD. Cardiovascular disease and osteoporosis: is there a link between lipids and bone? *Ann Clin Biochem.* 2002;39(Pt 3):203-10.
353. Nollet M, Santucci-Darmanin S, Breuil V, Al-Sahlanee R, Cros C, Topi M, et al. Autophagy in osteoblasts is involved in mineralization and bone homeostasis. *Autophagy.* 2014;10(11):1965-77.
354. Laroche M. [Arteriosclerosis and osteoporosis]. *Presse Med.* 1996;25(2):52-4.
355. Griffith JF, Yeung DK, Tsang PH, Choi KC, Kwok TC, Ahuja AT, et al. Compromised bone marrow perfusion in osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2008;23(7):1068-75.

356. Shih TT, Liu HC, Chang CJ, Wei SY, Shen LC, Yang PC. Correlation of MR lumbar spine bone marrow perfusion with bone mineral density in female subjects. *Radiology*. 2004;233(1):121-8.
357. Laroche M, Ludot I, Thiechart M, Arlet J, Pieraggi M, Chiron P, et al. Study of the intraosseous vessels of the femoral head in patients with fractures of the femoral neck or osteoarthritis of the hip. *Osteoporos Int*. 1995;5(4):213-7.
358. Laroche M, Moulinier L, Leger P, Lefebvre D, Mazieres B, Boccalon H. Bone mineral decrease in the leg with unilateral chronic occlusive arterial disease. *Clin Exp Rheumatol*. 2003;21(1):103-6.
359. Avina-Zubieta JA, Choi HK, Sadatsafavi M, Etminan M, Esdaile JM, Lacaille D. Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Arthritis Rheum*. 2008;59(12):1690-7.
360. Nicola PJ, Crowson CS, Maradit-Kremers H, Ballman KV, Roger VL, Jacobsen SJ, et al. Contribution of congestive heart failure and ischemic heart disease to excess mortality in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006;54(1):60-7.
361. Romero-Farina G, Candell-Riera J, Aguade-Bruix S, Ferreira-Gonzalez I, Cuberas-Borros G, Pizzi N, et al. Warranty periods for normal myocardial perfusion stress SPECT. *J Nucl Cardiol*. 2015;22(1):44-54.
362. Dessein PH, Semb AG. Could cardiovascular disease risk stratification and management in rheumatoid arthritis be enhanced? *Ann Rheum Dis*. 2013;72(11):1743-6.
363. Liao Y, McGee DL, Cooper RS, Sutkowski MB. How generalizable are coronary risk prediction models? Comparison of Framingham and two national cohorts. *Am Heart J*. 1999;137(5):837-45.
364. Dessein PH, Joffe BI, Veller MG, Stevens BA, Tobias M, Reddi K, et al. Traditional and nontraditional cardiovascular risk factors are associated with atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2005;32(3):435-42.
365. Semb AG, Kvien TK, Aastveit AH, Jungner I, Pedersen TR, Walldius G, et al. Lipids, myocardial infarction and ischaemic stroke in patients with rheumatoid arthritis in the Apolipoprotein-related Mortality RISK (AMORIS) Study. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(11):1996-2001.
366. Crowson CS, Gabriel SE. Towards improving cardiovascular risk management in patients with rheumatoid arthritis: the need for accurate risk assessment. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(5):719-21.
367. Brook RD, Bard RL, Patel S, Rubenfire M, Clarke NS, Kazerooni EA, et al. A negative carotid plaque area test is superior to other noninvasive atherosclerosis studies for reducing the likelihood of having underlying significant coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(3):656-62.
368. Yiu KH, Mok MY, Wang S, Ooi GC, Khong PL, Lau CS, et al. Prognostic role of coronary calcification in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol*. 2012;30(3):345-50.
369. Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Martin J, Gonzalez-Gay MA. Carotid intima-media thickness predicts the development of cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum*. 2009;38(5):366-71.
370. Evans MR, Escalante A, Battafarano DF, Freeman GL, O'Leary DH, del Rincon I. Carotid atherosclerosis predicts incident acute coronary syndromes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2011;63(5):1211-20.
371. Johnsen SH, Mathiesen EB. Carotid plaque compared with intima-media thickness as a predictor of coronary and cerebrovascular disease. *Curr Cardiol Rep*. 2009;11(1):21-7.
372. Mancini GB, Dahlof B, Diez J. Surrogate markers for cardiovascular disease: structural markers. *Circulation*. 2004;109(25 Suppl 1):IV22-30.
373. Greenland P, Alpert JS, Beller GA, Benjamin EJ, Budoff MJ, Fayad ZA, et al. 2010 ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: a report of

- the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56(25):e50-103.
374. Perk J, De Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren WM, et al. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012): The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Atherosclerosis*. 2012;223(1):1-68.
375. Roman MJ, Moeller E, Davis A, Paget SA, Crow MK, Lockshin MD, et al. Preclinical carotid atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med*. 2006;144(4):249-56.
376. Aubry MC, Maradit-Kremers H, Reinalda MS, Crowson CS, Edwards WD, Gabriel SE. Differences in atherosclerotic coronary heart disease between subjects with and without rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2007;34(5):937-42.
377. Kobayashi H, Giles JT, Polak JF, Blumenthal RS, Leffell MS, Szklo M, et al. Increased prevalence of carotid artery atherosclerosis in rheumatoid arthritis is artery-specific. *J Rheumatol*. 2010;37(4):730-9.
378. Fent GJ, Greenwood JP, Plein S, Buch MH. The role of non-invasive cardiovascular imaging in the assessment of cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: where we are and where we need to be. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(7):1169-75.
379. Lorenz MW, Polak JF, Kavousi M, Mathiesen EB, Volzke H, Tuomainen TP, et al. Carotid intima-media thickness progression to predict cardiovascular events in the general population (the PROG-IMT collaborative project): a meta-analysis of individual participant data. *Lancet*. 2012;379(9831):2053-62.
380. Rumberger JA, Simons DB, Fitzpatrick LA, Sheedy PF, Schwartz RS. Coronary artery calcium area by electron-beam computed tomography and coronary atherosclerotic plaque area. A histopathologic correlative study. *Circulation*. 1995;92(8):2157-62.
381. Hou ZH, Lu B, Gao Y, Jiang SL, Wang Y, Li W, et al. Prognostic value of coronary CT angiography and calcium score for major adverse cardiac events in outpatients. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2012;5(10):990-9.
382. Goff DC, Jr., Lloyd-Jones DM, Bennett G, Coady S, D'Agostino RB, Sr., Gibbons R, et al. 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(25 Pt B):2935-59.
383. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J*. 2016;37(29):2315-81.
384. Maurovich-Horvat P, Ferencik M, Voros S, Merkely B, Hoffmann U. Comprehensive plaque assessment by coronary CT angiography. *Nat Rev Cardiol*. 2014;11(7):390-402.
385. Task Force M, Montalescot G, Sechtem U, Achenbach S, Andreotti F, Arden C, et al. 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease: the Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2013;34(38):2949-3003.
386. Mavrogeni S, Dimitroulas T, Chatziioannou SN, Kitis G. The role of multimodality imaging in the evaluation of Takayasu arteritis. *Semin Arthritis Rheum*. 2013;42(4):401-12.
387. Chang SM, Nabi F, Xu J, Peterson LE, Achari A, Pratt CM, et al. The coronary artery calcium score and stress myocardial perfusion imaging provide independent and complementary prediction of cardiac risk. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(20):1872-82.

388. Joshi NV, Vesey AT, Williams MC, Shah AS, Calvert PA, Craighead FH, et al. 18F-fluoride positron emission tomography for identification of ruptured and high-risk coronary atherosclerotic plaques: a prospective clinical trial. *Lancet*. 2014;383(9918):705-13.
389. Murthy VL, Naya M, Foster CR, Hainer J, Gaber M, Di Carli G, et al. Improved cardiac risk assessment with noninvasive measures of coronary flow reserve. *Circulation*. 2011;124(20):2215-24.
390. Pennell DJ. Cardiovascular magnetic resonance. *Circulation*. 2010;121(5):692-705.
391. Sharma V, Binukrishnan S, Schoepf UJ, Ruzsics B. Myocardial tissue characterization with magnetic resonance imaging. *J Thorac Imaging*. 2014;29(6):318-30.
392. Moon JC, Reed E, Sheppard MN, Elkington AG, Ho SY, Burke M, et al. The histologic basis of late gadolinium enhancement cardiovascular magnetic resonance in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43(12):2260-4.
393. Moon JC, Messroghli DR, Kellman P, Piechnik SK, Robson MD, Ugander M, et al. Myocardial T1 mapping and extracellular volume quantification: a Society for Cardiovascular Magnetic Resonance (SCMR) and CMR Working Group of the European Society of Cardiology consensus statement. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2013;15:92.
394. Erhayiem B, Pavitt S, Baxter P, Andrews J, Greenwood JP, Buch MH, et al. Coronary Artery Disease Evaluation in Rheumatoid Arthritis (CADERA): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2014;15:436.
395. Ntusi NAB, Piechnik SK, Francis JM, Ferreira VM, Matthews PM, Robson MD, et al. Diffuse Myocardial Fibrosis and Inflammation in Rheumatoid Arthritis: Insights From CMR T1 Mapping. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2015;8(5):526-36.
396. Wong TC, Piehler K, Meier CG, Testa SM, Klock AM, Aneizi AA, et al. Association between extracellular matrix expansion quantified by cardiovascular magnetic resonance and short-term mortality. *Circulation*. 2012;126(10):1206-16.
397. Prasad SK, Vassiliou VS. Rheumatoid arthritis: mapping the future. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2015;8(5):537-9.
398. Giles JT, Malayeri AA, Fernandes V, Post W, Blumenthal RS, Bluemke D, et al. Left ventricular structure and function in patients with rheumatoid arthritis, as assessed by cardiac magnetic resonance imaging. *Arthritis Rheum*. 2010;62(4):940-51.
399. Myasoedova E, Davis JM, 3rd, Crowson CS, Roger VL, Karon BL, Borgeson DD, et al. Brief report: rheumatoid arthritis is associated with left ventricular concentric remodeling: results of a population-based cross-sectional study. *Arthritis Rheum*. 2013;65(7):1713-8.
400. Kozera L, Andrews J, Morgan AW. Cardiovascular risk and rheumatoid arthritis--the next step: differentiating true soluble biomarkers of cardiovascular risk from surrogate measures of inflammation. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50(11):1944-54.
401. Rodriguez-Rodriguez L, Lopez-Mejias R, Garcia-Bermudez M, Gonzalez-Juanatey C, Gonzalez-Gay MA, Martin J. Genetic markers of cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:574817.
402. Avouac J, Meune C, Chenevier-Gobeaux C, Dieude P, Borderie D, Lefevre G, et al. Inflammation and disease activity are associated with high circulating cardiac markers in rheumatoid arthritis independently of traditional cardiovascular risk factors. *J Rheumatol*. 2014;41(2):248-55.
403. Desai SS, Myles JD, Kaplan MJ. Suboptimal cardiovascular risk factor identification and management in patients with rheumatoid arthritis: a cohort analysis. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(6):R270.
404. Semb AG, Kvien TK, DeMicco DA, Fayyad R, Wun CC, LaRosa JC, et al. Effect of intensive lipid-lowering therapy on cardiovascular outcome in patients with and those without inflammatory joint disease. *Arthritis Rheum*. 2012;64(9):2836-46.
405. Rollefstad S, Kvien TK, Holme I, Eirheim AS, Pedersen TR, Semb AG. Treatment to lipid targets in patients with inflammatory joint diseases in a preventive cardio-rheuma clinic. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(12):1968-74.

406. van der Helm-van Mil AH, Knevel R, van der Heijde D, Huizinga TW. How to avoid phenotypic misclassification in using joint destruction as an outcome measure for rheumatoid arthritis? *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49(8):1429-35.
407. Combe B. Progression in early rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2009;23(1):59-69.
408. Landewe R, van der Heijde D, Klareskog L, van Vollenhoven R, Fatenejad S. Disconnect between inflammation and joint destruction after treatment with etanercept plus methotrexate: results from the trial of etanercept and methotrexate with radiographic and patient outcomes. *Arthritis Rheum*. 2006;54(10):3119-25.
409. Krabben A, Huizinga TW, Mil AH. Biomarkers for radiographic progression in rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Des*. 2015;21(2):147-69.
410. Lindqvist E, Jonsson K, Saxne T, Eberhardt K. Course of radiographic damage over 10 years in a cohort with early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2003;62(7):611-6.
411. Bathon J, Robles M, Ximenes AC, Nayiager S, Wollenhaupt J, Durez P, et al. Sustained disease remission and inhibition of radiographic progression in methotrexate-naïve patients with rheumatoid arthritis and poor prognostic factors treated with abatacept: 2-year outcomes. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(11):1949-56.
412. Rau R, Herborn G, Menninger H, Sangha O. Radiographic outcome after three years of patients with early erosive rheumatoid arthritis treated with intramuscular methotrexate or parenteral gold. Extension of a one-year double-blind study in 174 patients. *Rheumatology (Oxford)*. 2002;41(2):196-204.
413. Knevel R, Lukas C, van der Heijde D, Rincheval N, Combe B, van der Helm-van Mil AH. Defining erosive disease typical of RA in the light of the ACR/EULAR 2010 criteria for rheumatoid arthritis; results of the data driven phase. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(4):590-5.
414. van der Heijde DM. Plain X-rays in rheumatoid arthritis: overview of scoring methods, their reliability and applicability. *Baillieres Clin Rheumatol*. 1996;10(3):435-53.
415. Knevel R, Tsonaka R, le Cessie S, van der Linden MP, Huizinga TW, van der Heijde DM, et al. Comparison of methodologies for analysing the progression of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*. 2013;42(3):182-9.
416. Syversen SW, Landewe R, van der Heijde D, Bathon JM, Boers M, Bykerk VP, et al. Testing of the OMERACT 8 draft validation criteria for a soluble biomarker reflecting structural damage in rheumatoid arthritis: a systematic literature search on 5 candidate biomarkers. *J Rheumatol*. 2009;36(8):1769-84.
417. Too CL, Yahya A, Murad S, Dhaliwal JS, Larsson PT, Muhamad NA, et al. Smoking interacts with HLA-DRB1 shared epitope in the development of anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis: results from the Malaysian Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis (MyEIRA). *Arthritis Res Ther*. 2012;14(2):R89.
418. Knevel R, Grondal G, Huizinga TW, Visser AW, Jonsson H, Vikingsson A, et al. Genetic predisposition of the severity of joint destruction in rheumatoid arthritis: a population-based study. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(5):707-9.
419. Gregersen PK. Susceptibility genes for rheumatoid arthritis - a rapidly expanding harvest. *Bull NYU Hosp Jt Dis*. 2010;68(3):179-82.
420. van der Helm-van Mil AH, Huizinga TW, Schreuder GM, Breedveld FC, de Vries RR, Toes RE. An independent role of protective HLA class II alleles in rheumatoid arthritis severity and susceptibility. *Arthritis Rheum*. 2005;52(9):2637-44.
421. Lie BA, Viken MK, Odegard S, van der Heijde D, Landewe R, Uhlig T, et al. Associations between the PTPN22 1858C->T polymorphism and radiographic joint destruction in patients with rheumatoid arthritis: results from a 10-year longitudinal study. *Ann Rheum Dis*. 2007;66(12):1604-9.
422. Marinou I, Healy J, Mewar D, Moore DJ, Dickson MC, Binks MH, et al. Association of interleukin-6 and interleukin-10 genotypes with radiographic damage in rheumatoid arthritis is dependent on autoantibody status. *Arthritis Rheum*. 2007;56(8):2549-56.

423. Maxwell JR, Marinou I, Kuet KP, Orozco G, Moore DJ, Barton A, et al. Rheumatoid arthritis-associated polymorphisms at 6q23 are associated with radiological damage in autoantibody-positive RA. *J Rheumatol.* 2012;39(9):1781-5.
424. Scherer HU, van der Linden MP, Kurreeman FA, Stoeken-Rijsbergen G, Cessie S, Huizinga TW, et al. Association of the 6q23 region with the rate of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(3):567-70.
425. Knevel R, de Rooy DP, Gregersen PK, Lindqvist E, Wilson AG, Grondal G, et al. Studying associations between variants in TRAF1-C5 and TNFAIP3-OLIG3 and the progression of joint destruction in rheumatoid arthritis in multiple cohorts. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(10):1753-5.
426. Viatte S, Plant D, Lunt M, Fu B, Flynn E, Parker BJ, et al. Investigation of rheumatoid arthritis genetic susceptibility markers in the early rheumatoid arthritis study further replicates the TRAF1 association with radiological damage. *J Rheumatol.* 2013;40(2):144-56.
427. van der Linden MP, Feitsma AL, le Cessie S, Kern M, Olsson LM, Raychaudhuri S, et al. Association of a single-nucleotide polymorphism in CD40 with the rate of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009;60(8):2242-7.
428. Knevel R, de Rooy DP, Zhernakova A, Grondal G, Krabben A, Steinsson K, et al. Association of variants in IL2RA with progression of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2013;65(7):1684-93.
429. Buchs N, di Giovine FS, Silvestri T, Vannier E, Duff GW, Miossec P. IL-1B and IL-1Ra gene polymorphisms and disease severity in rheumatoid arthritis: interaction with their plasma levels. *Genes Immun.* 2001;2(4):222-8.
430. Prots I, Skapenko A, Wendler J, Mattyasovszky S, Yone CL, Spriewald B, et al. Association of the IL4R single-nucleotide polymorphism I50V with rapidly erosive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54(5):1491-500.
431. Marinou I, Till SH, Moore DJ, Wilson AG. Lack of association or interactions between the IL-4, IL-4Ralpha and IL-13 genes, and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(4):R80.
432. Krabben A, Wilson AG, de Rooy DP, Zhernakova A, Brouwer E, Lindqvist E, et al. Association of genetic variants in the IL4 and IL4R genes with the severity of joint damage in rheumatoid arthritis: a study in seven cohorts. *Arthritis Rheum.* 2013;65(12):3051-7.
433. Huizinga TW, Keijsers V, Yanni G, Hall M, Ramage W, Lanchbury J, et al. Are differences in interleukin 10 production associated with joint damage? *Rheumatology (Oxford).* 2000;39(11):1180-8.
434. Pawlik A, Kurzawski M, Szklarz BG, Herczynska M, Drozdik M. Interleukin-10 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2005;24(5):480-4.
435. Knevel R, Krabben A, Brouwer E, Posthumus MD, Wilson AG, Lindqvist E, et al. Genetic variants in IL15 associate with progression of joint destruction in rheumatoid arthritis: a multicohort study. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(10):1651-7.
436. Han SW, Sa KH, Kim SI, Lee SI, Park YW, Lee SS, et al. FCRL3 gene polymorphisms contribute to the radiographic severity rather than susceptibility of rheumatoid arthritis. *Hum Immunol.* 2012;73(5):537-42.
437. Maehlen MT, Nordang GB, Syversen SW, van der Heijde DM, Kvien TK, Uhlig T, et al. FCRL3 -169C/C genotype is associated with anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis and with radiographic progression. *J Rheumatol.* 2011;38(11):2329-35.
438. Sugiura Y, Niimi T, Sato S, Yoshinouchi T, Banno S, Naniwa T, et al. Transforming growth factor beta1 gene polymorphism in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2002;61(9):826-8.
439. Kim SY, Han SW, Kim GW, Lee JM, Kang YM. TGF-beta1 polymorphism determines the progression of joint damage in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 2004;33(6):389-94.
440. Matthey DL, Nixon N, Dawes PT, Kerr J. Association of polymorphism in the transforming growth factor {beta}1 gene with disease outcome and mortality in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2005;64(8):1190-4.

441. Wakil SJ, Abu-Elheiga LA. Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. *J Lipid Res.* 2009;50 Suppl:S138-43.
442. Sugihara T, Wadhwa R, Kaul SC, Mitsui Y. A novel testis-specific metallothionein-like protein, tesmin, is an early marker of male germ cell differentiation. *Genomics.* 1999;57(1):130-6.
443. Mo XB, Lu X, Zhang YH, Zhang ZL, Deng FY, Lei SF. Gene-based association analysis identified novel genes associated with bone mineral density. *PLoS One.* 2015;10(3):e0121811.
444. Weitzmann MN, Cenci S, Haug J, Brown C, DiPersio J, Pacifici R. B lymphocytes inhibit human osteoclastogenesis by secretion of TGFbeta. *J Cell Biochem.* 2000;78(2):318-24.
445. Hsu YH, Zillikens MC, Wilson SG, Farber CR, Demissie S, Soranzo N, et al. An integration of genome-wide association study and gene expression profiling to prioritize the discovery of novel susceptibility Loci for osteoporosis-related traits. *PLoS Genet.* 2010;6(6):e1000977.
446. Knevel R, Krabben A, Wilson AG, Brouwer E, Leijnsma MK, Lindqvist E, et al. A genetic variant in granzyme B is associated with progression of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2013;65(3):582-9.
447. Constantin A, Lauwers-Cances V, Navaux F, Abbal M, van Meerwijk J, Mazieres B, et al. Stromelysin 1 (matrix metalloproteinase 3) and HLA-DRB1 gene polymorphisms: Association with severity and progression of rheumatoid arthritis in a prospective study. *Arthritis Rheum.* 2002;46(7):1754-62.
448. Matthey DL, Nixon NB, Dawes PT, Ollier WE, Hajeer AH. Association of matrix metalloproteinase 3 promoter genotype with disease outcome in rheumatoid arthritis. *Genes Immun.* 2004;5(2):147-9.
449. Dorr S, Lechtenbohrer N, Rau R, Herborn G, Wagner U, Muller-Myhsok B, et al. Association of a specific haplotype across the genes MMP1 and MMP3 with radiographic joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2004;6(3):R199-207.
450. de Rooy DP, Zhernakova A, Tsonaka R, Willemze A, Kurreeman BA, Trynka G, et al. A genetic variant in the region of MMP-9 is associated with serum levels and progression of joint damage in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(6):1163-9.
451. Knevel R, Klein K, Somers K, Ospelt C, Houwing-Duistermaat JJ, van Nies JA, et al. Identification of a genetic variant for joint damage progression in autoantibody-positive rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(11):2038-46.
452. Harris ML, Darrah E, Lam GK, Bartlett SJ, Giles JT, Grant AV, et al. Association of autoimmunity to peptidyl arginine deiminase type 4 with genotype and disease severity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008;58(7):1958-67.
453. Shi J, Knevel R, Suwannalai P, van der Linden MP, Janssen GM, van Veelen PA, et al. Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(42):17372-7.
454. Knevel R, van Nies JA, le Cessie S, Huizinga TW, Brouwer E, van der Helm-van Mil AH. Evaluation of the contribution of cumulative levels of inflammation to the variance in joint destruction in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(2):307-8.
455. Tchetverikov I, Lard LR, DeGroot J, Verzijl N, TeKoppele JM, Breedveld FC, et al. Matrix metalloproteinases-3, -8, -9 as markers of disease activity and joint damage progression in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2003;62(11):1094-9.
456. Garnerio P, Gineyts E, Christgau S, Finck B, Delmas PD. Association of baseline levels of urinary glucosyl-galactosyl-pyridinoline and type II collagen C-telopeptide with progression of joint destruction in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002;46(1):21-30.
457. Jansen LM, van der Horst-Bruinsma I, Lems WF, van Schaardenburg D, van de Stadt R, de Koning M, et al. Serological bone markers and joint damage in early polyarthritis. *J Rheumatol.* 2004;31(8):1491-6.
458. Le Loet X, Brazier M, Mejjad O, Boumier P, Daragon A, Gayet A, et al. Serum IgA rheumatoid factor and pyridinoline in very early arthritis as predictors of erosion(s) at two

years: a simple model of prediction from a conservatively treated community-based inception cohort. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2010;62(12):1739-47.

459. Young-Min S, Cawston T, Marshall N, Coady D, Christgau S, Saxne T, et al. Biomarkers predict radiographic progression in early rheumatoid arthritis and perform well compared with traditional markers. *Arthritis Rheum*. 2007;56(10):3236-47.

460. Garnero P, Landewe R, Boers M, Verhoeven A, Van Der Linden S, Christgau S, et al. Association of baseline levels of markers of bone and cartilage degradation with long-term progression of joint damage in patients with early rheumatoid arthritis: the COBRA study. *Arthritis Rheum*. 2002;46(11):2847-56.

461. Krabben A, Knevel R, Huizinga TW, Cavet G, van der Helm-van Mil AH. Serum pyridinoline levels and prediction of severity of joint destruction in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2013;40(8):1303-6.

462. Lindqvist E, Eberhardt K, Bendtzen K, Heinegard D, Saxne T. Prognostic laboratory markers of joint damage in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2005;64(2):196-201.

463. Geusens PP, Landewe RB, Garnero P, Chen D, Dunstan CR, Lems WF, et al. The ratio of circulating osteoprotegerin to RANKL in early rheumatoid arthritis predicts later joint destruction. *Arthritis Rheum*. 2006;54(6):1772-7.

464. van Tuyl LH, Voskuyl AE, Boers M, Geusens P, Landewe RB, Dijkmans BA, et al. Baseline RANKL:OPG ratio and markers of bone and cartilage degradation predict annual radiological progression over 11 years in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(9):1623-8.

465. Meeuwisse CM, van der Linden MP, Rullmann TA, Allaart CF, Nelissen R, Huizinga TW, et al. Identification of CXCL13 as a marker for rheumatoid arthritis outcome using an in silico model of the rheumatic joint. *Arthritis Rheum*. 2011;63(5):1265-73.

466. McQueen FM, Stewart N, Crabbe J, Robinson E, Yeoman S, Tan PL, et al. Magnetic resonance imaging of the wrist in early rheumatoid arthritis reveals a high prevalence of erosions at four months after symptom onset. *Ann Rheum Dis*. 1998;57(6):350-6.

467. Hetland ML, Stengaard-Pedersen K, Junker P, Ostergaard M, Ejbjerg BJ, Jacobsen S, et al. Radiographic progression and remission rates in early rheumatoid arthritis - MRI bone oedema and anti-CCP predicted radiographic progression in the 5-year extension of the double-blind randomised CIMESTRA trial. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(10):1789-95.

468. McQueen FM, Stewart N, Crabbe J, Robinson E, Yeoman S, Tan PL, et al. Magnetic resonance imaging of the wrist in early rheumatoid arthritis reveals progression of erosions despite clinical improvement. *Ann Rheum Dis*. 1999;58(3):156-63.

469. McQueen FM, Benton N, Perry D, Crabbe J, Robinson E, Yeoman S, et al. Bone edema scored on magnetic resonance imaging scans of the dominant carpus at presentation predicts radiographic joint damage of the hands and feet six years later in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2003;48(7):1814-27.

470. Lindegaard HM, Vallo J, Horslev-Petersen K, Junker P, Ostergaard M. Low-cost, low-field dedicated extremity magnetic resonance imaging in early rheumatoid arthritis: a 1-year follow-up study. *Ann Rheum Dis*. 2006;65(9):1208-12.

471. Conaghan PG, O'Connor P, McGonagle D, Astin P, Wakefield RJ, Gibbon WW, et al. Elucidation of the relationship between synovitis and bone damage: a randomized magnetic resonance imaging study of individual joints in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2003;48(1):64-71.

472. Boyesen P, Haavardsholm EA, Ostergaard M, van der Heijde D, Sesseng S, Kvien TK. MRI in early rheumatoid arthritis: synovitis and bone marrow oedema are independent predictors of subsequent radiographic progression. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(3):428-33.

473. Ostergaard M, Hansen M, Stoltenberg M, Jensen KE, Szkudlarek M, Pedersen-Zbinden B, et al. New radiographic bone erosions in the wrists of patients with rheumatoid arthritis are detectable with magnetic resonance imaging a median of two years earlier. *Arthritis Rheum*. 2003;48(8):2128-31.

474. Scheel AK, Hermann KG, Ohrndorf S, Werner C, Schirmer C, Detert J, et al. Prospective 7 year follow up imaging study comparing radiography, ultrasonography, and magnetic resonance imaging in rheumatoid arthritis finger joints. *Ann Rheum Dis.* 2006;65(5):595-600.
475. Boyesen P, Haavardsholm EA, van der Heijde D, Ostergaard M, Hammer HB, Sesseng S, et al. Prediction of MRI erosive progression: a comparison of modern imaging modalities in early rheumatoid arthritis patients. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(1):176-9.
476. Dougados M, Devauchelle-Pensec V, Ferlet JF, Jousse-Joulin S, D'Agostino MA, Backhaus M, et al. The ability of synovitis to predict structural damage in rheumatoid arthritis: a comparative study between clinical examination and ultrasound. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(5):665-71.
477. Lillegraven S, Boyesen P, Hammer HB, Ostergaard M, Uhlig T, Sesseng S, et al. Tenosynovitis of the extensor carpi ulnaris tendon predicts erosive progression in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(11):2049-50.
478. Kiel DP, Ferrari SL, Cupples LA, Karasik D, Manen D, Imamovic A, et al. Genetic variation at the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) locus modulates Wnt signaling and the relationship of physical activity with bone mineral density in men. *Bone.* 2007;40(3):587-96.
479. Zofkova I, Hill M, Zajickova K. Association of C/T polymorphism in the LRP5 gene with circulating follicle stimulating hormone in Caucasian postmenopausal women. *Physiol Res.* 2007;56(6):735-9.
480. Yi J, Cai Y, Yao Z, Lin J. Genetic analysis of the relationship between bone mineral density and low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene polymorphisms. *PLoS One.* 2013;8(12):e85052.
481. Agueda L, Bustamante M, Jurado S, Garcia-Giralt N, Ciria M, Salo G, et al. A haplotype-based analysis of the LRP5 gene in relation to osteoporosis phenotypes in Spanish postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2008;23(12):1954-63.
482. Grundberg E, Lau EM, Lorentzon M, Karlsson M, Holmberg A, Groop L, et al. Large-scale association study between two coding LRP5 gene polymorphisms and bone phenotypes and fractures in men. *Osteoporos Int.* 2008;19(6):829-37.
483. Mencej-Bedrac S, Prezelj J, Kocjan T, Komadina R, Marc J. Analysis of association of LRP5, LRP6, SOST, DKK1, and CTNNB1 genes with bone mineral density in a Slovenian population. *Calcif Tissue Int.* 2009;85(6):501-6.
484. Furuya T, Urano T, Ikari K, Kotake S, Inoue S, Hara M, et al. A1330V polymorphism of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene and self-reported incident fractures in Japanese female patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 2009;19(2):140-6.
485. Massart F, Marini F, Bianchi G, Minisola S, Luisetto G, Pirazzoli A, et al. Genetic predictors of skeletal outcomes in healthy fertile women: the Bonturno study. *Joint Bone Spine.* 2013;80(4):414-9.
486. Markatseli AE, Hatzi E, Bouba I, Georgiou I, Challa A, Tigas S, et al. Association of the A1330V and V667M polymorphisms of LRP5 with bone mineral density in Greek peri- and postmenopausal women. *Maturitas.* 2011;70(2):188-93.
487. Zhou PR, Liu HJ, Liao EY, Zhang ZL, Chen DC, Liu J, et al. LRP5 polymorphisms and response to alendronate treatment in Chinese postmenopausal women with osteoporosis. *Pharmacogenomics.* 2014;15(6):821-31.
488. Klavdianou K, Liossis SN, Papachristou DJ, Theocharis G, Sirinian C, Kottorou A, et al. Decreased Serotonin Levels and Serotonin-Mediated Osteoblastic Inhibitory Signaling in Patients With Ankylosing Spondylitis. *J Bone Miner Res.* 2016;31(3):630-9.
489. Richards JB, Papaioannou A, Adachi JD, Joseph L, Whitson HE, Prior JC, et al. Effect of selective serotonin reuptake inhibitors on the risk of fracture. *Arch Intern Med.* 2007;167(2):188-94.

490. Hirowatari Y, Hara K, Kamihata H, Iwasaka T, Takahashi H. High-performance liquid chromatographic method with column-switching and post-column reaction for determination of serotonin levels in platelet-poor plasma. *Clin Biochem*. 2004;37(3):191-7.
491. Kim HY, Park MH, Yoon HK, Han KO. The changes in plasma serotonin levels after hormone therapy and their relationship with estrogen responsiveness on bone in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(6):1986-94.
492. Wang Q, Chen D, Nicholson P, Cheng S, Alen M, Mao L, et al. The associations of serum serotonin with bone traits are age- and gender-specific. *PLoS One*. 2014;9(10):e109028.